

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**Aislamiento y caracterización molecular de los genes
trealosa-6-fosfato sintetasa (*TPS*) y trealosa-6-fosfato
fosfatasa (*TPP*) y su relación en la tolerancia a estrés
abiótico en plántulas de maíz (*Zea mays*)**

Tesis para obtener el título de

Doctor en Ciencias Agrícolas

Presenta

M. C. Phamela Acosta Pérez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



Aislamiento y caracterización molecular de los genes trealosa-6-fosfato sintetasa (*TPS*) y trealosa-6-fosfato fosfatasa (*TPP*) y su relación en la tolerancia a estrés abiótico en plántulas de maíz (*Zea mays*)

Tesis para obtener del grado de:

Doctor en Ciencias Agrícolas

Presenta

M. C. Phamela Acosta Pérez

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

COMITÉ PARTICULAR



Dra. Sugey R. Sinagawa García
Directora

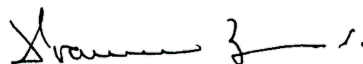


Dra. María Jazmín Abraham Juárez

Co-Director



Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez
Asesor



Dr. Francisco Zavala García
Asesor



Dr. Edward A. Espinoza Sánchez
Asesor



Dr. Juan Antonio Vidales Contreras
Subdirección de Estudios de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

Detrás de la tormenta siempre llega la calma y finalmente señor está aquí, el cumplir y terminar con éxito este arduo y duro trabajo. Señor gracias por todas aquellas cosas que pude vivir, aprender, y que nunca olvidare, por ser mi apoyo, fuerza y fortaleza, todo te lo debo a ti y por ti.

A mis Padres, Diógenes y Marinin, por cada momento invertido en este largo trayecto que a veces fueron de incertidumbre, alegrías y a veces tristeza, por cada momento que lo dedicaron a esta jalea del sándwich, las palabras de aliento, los consejos y disputas que gracias a ellas y muchas otras cosas más, han forjado lo que soy hoy.

A mis Hermanas, Diomaris y Némesis, las dos siempre han mi apoyo, Diomaris, con tu gran visión, dedicación y entusiasmo, que me inspiran a seguir y saber que, aunque las cosas pinten desfavorablemente, en el mañana con un poco de pasión y determinación puede ser el inicio de un gran camino lleno de éxito, dicha y felicidad y Némesis por que, aun sin saberlo, enseñarme a ser fuerte y luchar por lo que quiero, gracias.

A mis Amigos, a todos ellos por ser parte de vida, ser fuente de entusiasmo, dedicación y trabajo. A ustedes por ser fuente de aliento en los malos momentos, en especial a Adiel, Enrique, Karen, Michelle, Francisco, Karina, Tony y Bianka, gracias a ustedes, por pasar por todo esto conmigo, se los agradezco de corazón.

A mis compañeros, gracias Blanca, Dante, Jesús, por estar conmigo en este arduo camino, por ser quién eres y además de todo, un ejemplo; por qué junto a ti, he aprendido muchas cosas y experiencias que nunca olvidare, por estar ahí para mí, poder soportarme, y cuidarme, como una hermana más.

A las Familias Ortega Lozano, López Flores, Sánchez Gonzales, García Sinagawa, gracias por estar junto a mí en este camino, por quererme como una hija más, por el apoyo brindado y su ayuda incondicional, gracias por todo.

Y a todas aquellas personas que directamente e indirectamente ayudaron a que en el día de hoy pueda disfrutar de esta gran celebración que es mi graduación.

AGRADECIMIENTO

Alguien alguna vez dijo: “Se alcanza el éxito, convirtiendo cada paso en una meta y cada meta en un paso”. Este es el resumen de todos esos pasos y de las personas que me acompañaron hasta lograr esta meta.

Agradezco primero a Dios por el don de la vida, por regalarme la capacidad y sabiduría, permitirme llegar a este camino, recorrerlo aun con sus piedras y tropiezos y ayudarnos a finalizarlo con éxito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo y beca otorgada.

A nuestra Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Agronomía y sus directores, por su apoyo, dedicación y lineamientos que guiaron nuestra formación.

A mis profesores, por mostrarme y guiarme por el sendero de la sabiduría. Por su dedicación y labor altruista y poner a mi disposición sus conocimientos. Es para mí un honor haber culminado esta etapa de mi vida con cada uno de sus aportes. A Blanca y Dante por su buen ánimo y ayuda incondicional, para mí siempre han sido más que parte del personal de esta facultad, son mis amigos.

A nuestros asesores, Juanita Guadalupe Gutiérrez, Maria Jazmín Abraham, Francisco Zavala y Edward A. Sánchez, por su dedicación y apoyo durante este arduo trabajo.

A mi directora de tesis, Dra. Sugey Sinagawa García, gracias por esta oportunidad. Por ser una gran maestra, educadora y por apoyarme siempre que lo necesité.

A mis padres, familiares y amigos, por su amor incondicional, su apoyo moral y emocional. Ustedes fueron la palanca para realizar mi sueño. Ustedes me regalaron el sentido, la capacidad y la confianza de creer que era capaces de lograr nuestra meta.

Al CIDICS y CAP, que nos abrieron las puertas y muy amablemente me proporcionaron las instrumentos y equipos necesarias para la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pagina
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	5
1.1.1 Objetivo General.....	5
1.1.2 Objetivo Especificos	5
1.2 Hipótesis	6
 CAPITULO 1. CARACTERIZACION DE LOS GENES TREALOSA-6-FOSFATO SINTASA Y TREHALOSA-6-FOSFATO FOSFATASA Y SU EXPRESION DIFERENCIAL IN PLANTULAS DE MAIZ (<i>Zea mays</i>) BAJO ESTRÉS POR SEQUÍA	
2.1 Resumen	7
2.2 Introducción.....	8
2.3 Materiales y Métodos	13
2.3.1 Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamiento de estrés ...	13
2.3.2 Tratamientos de riego.....	13
2.3.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	14
2.3.4 Clonación de los genes que codifican para <i>TPS/TPP</i> y análisis de las secuencias.....	14
2.3.5 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	16
2.4 Resultados	18
2.4.1 Clonación y caracterización de ADNc de <i>TPS</i> y <i>TPP</i>	18
2.4.2 Análisis de secuencias de aminoácidos y relación filogenética de los genes <i>TPS</i>	18
2.4.5 Análisis de secuencia de aminoácidos y relación filogenética de los genes <i>TPP</i>	21
2.4.6 Análisis <i>in silico</i> de sitios catalíticos.....	22
2.4.7 PCR cuantitativa en tiempo real	25

2.8	Discusión	28
2.9	Conclusiones	32
2.10	Bibliografía	33

CAPITULO 2. EVALUACIÓN FENOTÍPICA, BIOQUIMICA Y FISIOLÓGICA EN PLÁNTULAS DE MAÍZ (*Zea mays*) BAJO ESTRÉS OSMÓTICO Y EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES PRECURSORES DE TREALOSA: TREALOSA-6-FOSFATO SINTASA Y TREHALOSA-6-FOSFATO FOSFATASA

3.1	Resumen	43
3.2	Introducción	44
3.3	Materiales y Métodos	48
3.3.1	Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamiento de estrés ...	48
3.3.2	Tratamientos de salinidad	48
3.3.3	Evaluación fenotípica y fisiológica de plántulas de maíz bajo estrés osmótico	49
3.3.3.1	Pigmentos fotosintéticos	49
3.3.3.2	Determinación de la estabilidad de membrana (CMS)	50
3.3.3.3	Evaluación de parámetros bioquímicos	50
3.3.3.3.1	Material vegetal y preparación de extractos	50
3.3.3.3.2	Determinación del contenido total de azúcares	51
3.3.3.3.3	Determinación del contenido de prolina	51
3.3.3.4	Ensayos de actividad enzimática	52
3.3.3.4.1	Actividad de Superóxido de Dismutasa (SOD)	52
3.3.3.4.3	Actividad de Ascorbato Peroxidasa (APX)	53
3.3.3.4.4	Actividad de Catalasa (CAT)	53
3.3.3.5	Extracción de ARN y síntesis de ADNc	54
3.3.3.6	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	54
3.3.3.7	Análisis estadístico	55
3.4	Resultados	56
3.4.1	Análisis de altura plántulas y numero de hojas bajo estrés osmótico.	56
3.4.2	Pigmentos fotosintéticos	57
3.4.3	Estabilidad de la membrana (CMS)	59

3.4.4	Azúcares totales	60
3.4.5	Prolina	62
3.4.6	Actividad Superóxido de Dismutasas (SOD)	63
3.4.7	Actividad de Peroxidasa (POD)	64
3.4.8	Actividad de (Ascorbato Peroxidasa) APX.....	65
3.4.9	Actividad de Catalasa (CAT)	67
3.4.10	Expresión relativa de los genes <i>TPS</i> y <i>TPP</i> bajo estrés osmótico.....	68
3.5	Discusión	74
3.6	Conclusión	80
3.7	Bibliografía	81
ANEXOS	90

ÍNDICE DE CUADROS

Anexos

Tabla 1. Efecto del estrés salino en los parámetros fenotípicos en plántulas de maíz (<i>Zea mays</i>) por aplicación de solución a base de NaCl.	90
Tabla 2. Efecto del estrés salino en los parámetros fisiológicos en plántulas de maíz (<i>Zea mays</i>) por aplicación de solución a base de NaCl.	91
Tabla 3. Efecto del estrés salino en los parámetros bioquímicos en plántulas de maíz (<i>Zea mays</i>) por aplicación de solución a base de NaCl.	92
Tabla 4. Efecto del estrés salino en los parámetros enzimáticos en plántulas de maíz (<i>Zea mays</i>) por aplicación de solución a base de NaCl.	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1. Caracterización de los genes trealosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa y su expresión diferencial in plántulas de maíz (*Zea mays*) bajo estrés por sequía.

- Figura 1. Análisis de secuencia de aminoácidos y relación filogenética de los genes *TPS-2* y *TPS-3*: (a) Análisis de dominios de los genes *TPS-2*; (b) Análisis de dominios de los genes *TPS-3*; (c) Modelado computacional de la estructura en cinta de la proteína *TPS-2*; (d) Modelado computacional de gen *TPS-3*; (e) Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de *TPS-2* y *TPS-3*.20
- Figura 2. Análisis de secuencia de aminoácidos y relación filogenética del gen *TPP-1*: (a) Análisis de búsqueda de dominios para el gen *TPP-1*; (b) Modelado computacional de la proteína *TPP-1*; (c) Árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos de *TPP*.21
- Figura 3. Análisis in silico de sitios catalíticos de los genes *TPS*: (a) Modelo de proteína *TPS-2* con los sitios catalíticos; (b) proteína *TPS-3* con la ubicación del sitio activo; (c) Alineamientos múltiples de la secuencia de aminoácidos de *TPS-2* y *TPS-3* con otras proteínas *TPS* funcionales de otras especies.23
- Figura 4. Análisis in silico de sitios catalíticos del gen *TPP*: (a) Modelo de proteína *TPP-1* con los sitios catalíticos; (b) Alineamientos de los dominios *TPP* de *TPP-1* junto con otras proteínas *TPP* funcionales de diferentes especies.24
- Figura 5. Resultados cuantitativos en tiempo real del cambio en la expresión de los genes *TPS-3* y *TPP-1* en plántulas de maíz (*Zea mays*) resistentes y susceptibles sometidas a estrés por sequía. Los datos de expresión fueron reportados como $\text{Log}_2 (-\Delta\Delta\text{Ct})$, el aumento en la expresión toma un valor positivo mientras que la disminución en la expresión es negativa, esto comparado con la expresión de las plántulas con riego. Los valores son la media \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las líneas en el mismo período de tiempo ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey: a) Expresión relativa del gen *TPS-3* en hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles; b) Expresión relativa del gen *TPP-1* en hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles.27

Capítulo 2. Evaluación fenotípica, bioquímica y fisiológica en plántulas de maíz (*Zea mays*) bajo estrés osmótico y expresión diferencial de los genes precursores de trealosa: trealosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa

- Figura 1. Evaluación agronómica de plántulas de maíz sometidos a estrés salino. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey: (a) Altura de planta; (b) Numero de hojas..... 57
- Figura 2. Concentración de los diferentes pigmentos fotosintéticos: clorofila tipo a (chl a), clorofila tipo b (chl b) y carotenoides (caro) en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey..... 59
- Figura 3. Porcentaje de daño presentado por las plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. 60
- Figura 4. Concentración de los diferentes azúcares, pentosa y hexosas, en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey. 62
- Figura 5. Concentración de prolina libre en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey..... 63
- Figura 6. Actividad de SOD en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre líneas y tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey..... 64
- Figura 7. Actividad de POD en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre los efectos principales: líneas y tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey..... 65

Figura 8. Actividad de APX en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre líneas ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.	66
Figura 9. Actividad de CAT en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas dada la interacción de los componentes principales: líneas y tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.....	67
Figura 10. Resultados cuantitativos en tiempo real del cambio en la expresión del gen <i>TPS-3</i> en plántulas de maíz (<i>Zea mays</i>) resistentes y susceptibles sometidas a estrés salino. Los datos de expresión fueron reportados como $\text{Log}_2 (-\Delta\Delta\text{Ct})$, el aumento en la concentración toma un valor positivo mientras que una disminución es negativa, esto con referencia a los valores expresados bajo condiciones de riego. Los valores son medios \pm SD. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las líneas en el mismo período de tiempo ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey: a) Expresión relativa del gen <i>TPS-3</i> en las hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles en los diferentes tiempos de toma de muestra bajo la salinidad 3.7; b) Expresión relativa del gen <i>TPS-3</i> en las hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles en los diferentes tiempos de toma de muestra bajo la salinidad 6.7.	69
Figura 11. Resultados cuantitativos en tiempo real del cambio en la expresión del gen <i>TPP-1</i> en plántulas de maíz (<i>Zea mays</i>) resistentes y susceptibles sometidas a estrés salino. Los datos de expresión fueron reportados como $\text{Log}_2 (-\Delta\Delta\text{Ct})$, el aumento en la concentración toma un valor positivo mientras que una disminución es negativa, esto con referencia a los valores expresados bajo condiciones de riego. Los valores son medios \pm SD. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las líneas en el mismo período de tiempo ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey: a) Expresión relativa del gen <i>TPP-1</i> en las hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles en los diferentes tiempos de toma de muestra bajo la salinidad 3.7; b) Expresión relativa del gen <i>TPP-1</i> en las hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles en los diferentes tiempos de toma de muestra bajo la salinidad 6.7.	71

RESUMEN

El maíz es el cultivo más importante alrededor del mundo, es altamente sensible al estrés abiótico causado por la sequía, la salinidad excesiva y las temperaturas extremas. En plantas, la trealosa tiene un papel clave como mediador frente a diferentes tipos de estrés abiótico, como la sequía, las temperaturas altas y bajas, y el estrés osmótico. Por lo tanto, su papel en la adaptación de la planta a diversas condiciones de estrés ha sido ampliamente documentado. El objetivo de este trabajo fue clonar y caracterizar molecularmente los genes *TPS* y *TPP* del maíz y evaluar el efecto agronómico y fisiológico mostrado por las plántulas bajo estrés abiótico. Para esto, líneas de maíz resistentes y susceptibles fueron sometidas a estrés hídrico y osmótico por durante 72 h. En el caso del estrés hídrico se obtuvieron dos ADNc de longitud completa de *TPS* y uno de *TPP*, los cuales fueron clonados y secuenciados. Del mismo modo, las secuencias de aminoácidos de *TPS* y *TPP* se alinearon con secuencias homólogas de diferentes especies, mostrando dominios altamente conservados y los mismos sitios catalíticos. La expresión relativa de ambos genes se realizó mediante RT-qPCR en diferentes momentos. El patrón de expresión mostró una sobreexpresión significativamente después de 0,5 horas en líneas resistentes y en el caso de las susceptibles el patrón de expresión se activó después de la primera hora y hasta las cuatro horas, mostrando su participación en la respuesta al estrés por sequía.

Por su parte, los resultados del estrés osmótico mostraron que en la mayoría de los casos se observó un incremento en el número de hojas, altura de planta, pigmentos

fotosintéticos, estabilidad de membrana azúcares totales, prolina y las enzimas antioxidantes SOD, POD, APX y CAT. El análisis de expresión relativa por RT-qPCR mostró expresión diferencial a diferentes tiempos de ambos genes *TPS* y *TPP*, presentándose una inducción significativamente después de 0,5 horas para líneas resistentes y después 6 horas en la mayoría de los casos en las plantas susceptibles, mostrando su participación en la respuesta al estrés osmótico. En términos generales bajo los dos estrés osmótico, se observó una variación en el número de hojas, la altura de la planta y los pigmentos fotosintéticos dependiendo el genotipo y nivel de estrés. Así como, un aumento en el daño en la membrana celular, azúcares totales, actividad de APX y CAT, además de una disminución en la concentración de prolina y POD.

Este estudio presentó una información básica de las diferentes isoformas de *TPS* y *TPP* expresadas en el maíz y esta información podría utilizarse en futuras investigaciones sobre la participación de la trealosa en plantas bajo estrés por sequía y osmótico.

ABSTRACT

Maize is the most important crop around the world, it is highly sensitive to abiotic stress caused by drought, excessive salinity and extreme temperatures. In plants, trehalose plays a key role as a mediator against different abiotic stresses, such as drought, high and low temperatures, and osmotic stress. Therefore, its role in plant adaptation to various stress conditions has been widely documented. The aim of this work was to clone and molecularly characterize the *TPS* and *TPP* genes of corn and to evaluate the agronomic and physiological effect shown by seedlings under abiotic stress. For this purpose, resistant and susceptible corn lines were subjected to drought stress, as well as to salinity stress during 72 h. In the case of water stress, two cDNAs of full length of *TPS* and one of *TPP* were obtained, which were cloned and sequenced. Similarly, the amino acid sequences of *TPS* and *TPP* were aligned with homologous sequences of different species, showing highly conserved domains and the same catalytic sites. The relative expression of both genes was performed by RT-qPCR at different times. The expression pattern showed a significant overexpression after 0.5 hours in resistant lines and in the case of the susceptible ones the expression pattern was activated after the first hour and up to four hours, showing its participation in the response to drought stress.

On the other hand, the results of osmotic stress showed that in most cases an increase in the number of leaves, plant height, photosynthetic pigments, membrane stability, total sugars, proline and the antioxidant enzymes SOD, POD, APX and CAT was observed. Relative expression analysis by RT-qPCR showed differential expression at

different times of both *TPS* and *TPP* genes, presenting an induction significantly after 0.5 hours for resistant lines and after 6 hours in most cases in susceptible plants, showing their participation in the response to osmotic stress. types of stress the number of leaves, plant height and photosynthetic pigments decreased, while free proline content and SOD increased, and in the case of salinity stress an increase in cell membrane damage, total sugars, APX and CAT activity was observed; as well as a decrease in proline and POD concentration.

RT-qPCR was performed, which shows the differential expression of both genes under drought and saline stress. This study presented basic information on the different isoforms of *TPS* and *TPP* expressed in corn and this information could be used in further research on the role of trehalose in the plant under drought and salt stress.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático y la agricultura son procesos relacionados entre sí que tienen importancia a nivel mundial (Yohannes, 2016). La agricultura es uno de los sistemas más sensibles al cambio climático ya que incrementa especialmente las concentraciones de CO₂ atmosférico, lo que resultará en el incremento de la temperatura a nivel global y cambios en los patrones de lluvia (Meza y Silva, 2009; Tao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). Estos cambios pueden afectar directa o indirectamente la producción agrícola y la seguridad alimentaria en el futuro (Lee *et al.*, 2011). En México, existen investigaciones para medir las posibles consecuencias del cambio climático desde distintas perspectivas y sobre diversos sectores prioritarios del país. De acuerdo a Villers-Ruiz y Trejo-Vázquez (1997) más de la mitad del territorio del país (entre el 50% y el 57%) cambiará sus condiciones de temperatura y precipitación de manera que el clima actual podría ser clasificado en otro subtipo y todos los ecosistemas deberán cambiar para adaptarse a las nuevas condiciones.

El estrés abiótico como sequía, salinidad, altas o bajas temperaturas, luz, déficit o exceso de nutrientes, metales pesados, solos o combinados alteran el metabolismo de las plantas lo que conduce a efectos negativos sobre el crecimiento, el desarrollo y la productividad de las plantas (Park *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2006). Además, cuando se mantienen de manera activa y/o por un tiempo prolongado, puede conducir a una carga metabólica insoportable sobre las células provocando clorosis, retardando el crecimiento y en condiciones extremas, la muerte de la

planta (Rao *et al.*, 2006). Se estima que sólo un 10% de la superficie de la tierra cultivable se encuentra libre de algún tipo de estrés, como consecuencia de esto existe una fuerte restricción en el aumento de la productividad de los cultivos y el aprovechamiento de los recursos naturales.

En presencia de estrés, las plantas activan mecanismos de defensa que les permiten tolerarlos hasta ciertos niveles (Chen y Murata, 2011). La respuesta fisiológica de las plantas para contrarrestar estos efectos está dada por cambios en la expresión génica vía inducción de un gran número de proteínas, los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: 1) la que las protegen directamente contra el estrés ambiental aquí se encuentran genes que codifican proteínas que protegen a las células de la deshidratación, incluyendo enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectantes, anticongelantes, chaperonas y enzimas destoxificantes 2) la que regulan la expresión de genes y traducción de señales durante la respuesta a estrés. En este grupo se encuentran los factores de transcripción, cinasas que son, enzimas involucradas en el metabolismo de fosfoinosítidos (Arakawa y Timasheff, 1985; Chen y Jiang, 2010; Chen y Murata, 2011; Hare *et al.*, 1998; Iturriaga *et al.*, 2009b).

Con base a lo anterior, dentro del primer tipo de respuesta al estrés se encuentran algunos osmolitos involucrados en la homeostasis celular como la glicina-betaína, prolina, alcoholes y azúcares como la trealosa que se acumulan en las células en respuesta al estímulo para mantener la homeostasis y la integridad de las proteínas (Drennan *et al.*, 1993; Ingram y Bartels, 1996; Yancey *et al.*, 1982). La trealosa es

un disacárido natural constituido por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace α , α -1,1-glucosídico, se almacena como carbohidrato de reserva y está presente únicamente en el citosol de múltiples organismos excepto mamíferos (Elbein, 1974; Iturriaga, Suárez, y Nova-Franco, 2009; Patist y Zoerb, 2005). Se encuentra en su forma deshidratada y se caracteriza por su alta higroscopicidad, polimorfismo y su estabilidad a altas temperaturas lo que le permite permanecer intacta por largos periodos de tiempo comparado con otros azúcares (Iturriaga *et al.*, 2009; Sussich *et al.*, 1998); por lo anterior, la trealosa, juega un papel importante como mediador ante el estrés (deseccación, congelamiento, estrés osmótico, inanición) (Lunn *et al.*, 2014). También se ha reportado que desempeña un papel en los mecanismos de virulencia aún en organismos no emparentados (Woodruff *et al.*, 2004).

Debido a que la trealosa puede coadyuvar a la estabilización de proteínas y membranas biológicas se ha convertido en un objetivo de la biotecnología para la generación de alimentos (Roser, 1991), farmacéutica, cosméticos, crioprotectores (Bhandal *et al.*, 1985; Schiraldi *et al.*, 2002) y en la industria forrajera con la generación de suplementos y biocombustibles (Chang *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2009). Por lo anterior, las enzimas para la biosíntesis de la trealosa han sido estudiadas extensamente en diferentes organismos como *Escherichia coli* (trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa). Estas enzimas están codificadas por los genes *otsA* y *otsB* que constituyen un operón los cuales son similares a los genes *TPS1* y *TPS2* en levadura. En *Saccharomyces cerevisiae* las dos enzimas son combinadas en un solo complejo llamado “complejo trehalosa

sintasa” el cual incluye las subunidades reguladoras *ts/1* y *TPS3* (Bell *et al.*, 1998; Kaasen, McDougall y Strøm, 1994).

Por otro lado, el maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cultivos en el mundo no sólo por su importancia en la alimentación tanto humana como animal, sino también por sus usos a nivel industrial, en la producción de biocombustibles, entre otros (Cruz *et al.*, 2014). En México, para el 2016 la producción aproximada de maíz se ubicó en 25.7 millones de toneladas, mientras que la demanda del grano fue de 27.1 millones de toneladas, sobresaliendo un déficit de 1.4 millones de toneladas en el país, por lo que se ha tenido que recurrir a la importación para cubrir la demanda (SAGARPA, 2016). El maíz es sensible al estrés abiótico, reduciendo su rendimiento hasta un 7% a nivel mundial (Porter *et al.*, 2017). Diferentes investigaciones se han realizado sobre la función y sobreexpresión de trealosa en plantas, como *Arabidopsis thaliana*, obteniendo líneas con un incremento significativo de tolerancia a sequía, salinidad, heladas y calor. Lo anterior, abre la posibilidad de estudiar el efecto de la trealosa en cultivos importantes como el maíz con diferentes tipos de estrés abiótico (Lin *et al.*, 2019; Miranda *et al.*, 2007).

Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue clonar y caracterizar molecularmente los genes involucrados en la síntesis de trealosa *TPS/TPP* en plántulas de maíz sometidas bajo estrés abiótico y evaluar su expresión relativa diferencial; así como los cambios fenotípicos, fisiológicos y bioquímicos de las plántulas de maíz bajo estrés.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar molecularmente los genes de trealosa-6-fosfato sintetasa (*TPS*) y trealosa-6-fosfato fosfatasa (*TPP*), así como analizar su relación con la tolerancia a estrés hídrico y osmótico en plántulas de maíz.

1.1.2 Objetivo Específicos

- 1.1.2.1. Establecer un protocolo de estrés hídrico y osmótico en plantas de maíz.
- 1.1.2.2. Clonar y caracterizar los genes involucrados en la síntesis de trealosa en plantas de maíz sometidas a estrés hídrico y salino.
- 1.1.2.3. Evaluar cambios fenotípicos, fisiológicos y bioquímicos de las plantas bajo estrés hídrico y salino.
- 1.1.2.4. Determinar los niveles expresión de los genes involucrados en la síntesis de la trealosa mediante RT-qPCR.

1.2 HIPÓTESIS

1.1.1 La trealosa tiene un papel importante en la tolerancia de los organismos a diferentes tipos de estrés biótico y/o abiótico; por lo tanto, plántulas de maíz expuesta a estrés abiótico aumenta la expresan diferencialmente genes involucrados en la síntesis de trealosa.

1.1.2 Plantas que sobreexpresan los genes involucrados en la síntesis de trealosa aumenta su capacidad para tolerar estrés abiótico; por lo tanto, las plantas de maíz resistentes sometidas a estrés presentan mayor expresión de los genes *TPS* y *TPP* que plantas susceptibles.

CAPITULO 1. CARACTERIZACION DE LOS GENES TREALOSA-6-FOSFATO SINTASA Y TREHALOSA-6-FOSFATO FOSFATASA Y SU EXPRESION DIFERENCIAL IN PLANTULAS DE MAIZ (*Zea mays*) BAJO ESTRÉS POR SEQUÍA

2.1 Resumen

El maíz es uno de los cultivos más importante del mundo y es muy sensible al estrés abiótico causado por la sequía, la salinidad excesiva y las temperaturas extremas. En las plantas, la trealosa ha sido ampliamente estudiada por su papel en la adaptación a diferentes estreses abióticos como la sequía, las temperaturas altas y bajas y el estrés osmótico. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue clonar y caracterizar molecularmente los genes trealosa-6-fosfato sintasa (*TPS*) y trealosa-6-fosfato fosfatasa (*TPP*) del maíz y evaluar su expresión diferencial en plántulas de maíz bajo estrés por sequía. Para esto, líneas de maíz resistentes y susceptibles fueron sometidas a estrés por sequía durante 72 h. Entre los resultados obtenidos, dos ADNc de longitud completa de *TPS* y uno de *TPP* fueron clonados y secuenciados. Del mismo modo, las secuencias de aminoácidos de *TPS* y *TPP* se alinearon con secuencias homólogas de diferentes especies, mostrando dominios altamente conservados y los mismos sitios catalíticos. La expresión relativa de ambos genes se realizó mediante RT-qPCR en diferentes momentos. El patrón de expresión mostró una sobreexpresión significativa después de 0,5 horas iniciado el estrés en líneas resistentes y en el caso de las susceptibles el patrón de expresión se activó después de 2 – 4 h, mostrando su participación en la respuesta al estrés por sequía.

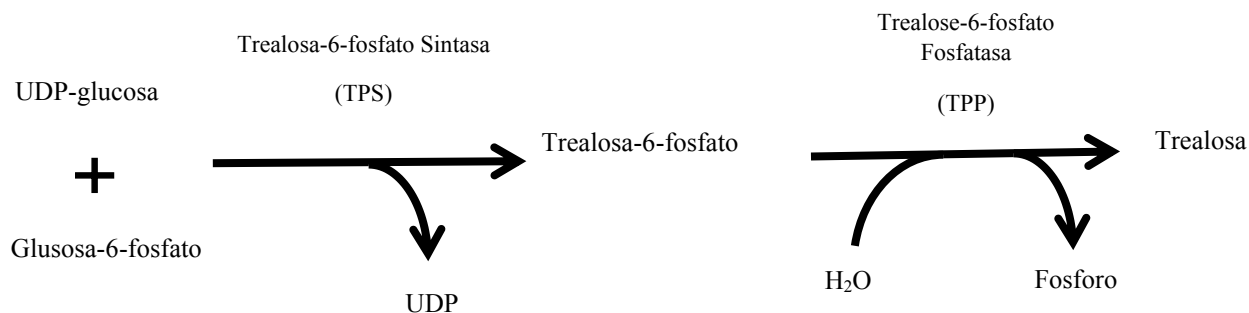
2.2 Introducción

Las fluctuaciones de temperatura causadas por el cambio climático afectan negativamente a muchas plantas causando clorosis, atraso en el crecimiento y, en casos extremos la muerte de la planta. En respuesta a estas condiciones las plantas son capaces de acumular diferentes compuestos orgánicos, como azúcares solubles y aminoácidos libres conocido como osmoprotectores. Uno de estos compuesto es una disacárido llamado trealosa, la cual puede acumularse hasta un 12% del peso seco de la célula para mantener su integridad (Mostofa *et al.*, 2015; Wingler, 2002). La trealosa es un osmolito que está asociado a la tolerancia de diferentes tipos de estrés abiótico, como sequía, temperaturas altas y bajas así como por estrés osmótico, desempeñando un papel vital como mediador (Iturriaga *et al.*, 2009b; Patist y Zoerb, 2005b). La trealosa es un disacárido natural formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace α , α -1,1-glucosídico. Este carbohidrato es sintetizado por muchos organismos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos, invertebrados, algas y cianobacterias (Chang *et al.*, 2010b; Iturriaga *et al.*, 2009b; Klähn y Hagemann, 2011; Lunn *et al.*, 2014).

Las propiedades físico-químicas, como la ausencia de extremos reductores que intervienen en la formación del enlace glucosídico, hacen que este disacárido sea resistente al calor, al pH y a la reacción de Maillard, además de ser capaz de formar una estructura similar al vidrio que puede estabilizar las enzimas, las proteínas y las membranas lipídicas; lo que confiere a la trealosa no sólo ser una fuente de energía sino también la capacidad de proteger las estructuras biológicas de los daños durante

el estrés abiótico (Abdelgawad *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2013; Mostofa *et al.*, 2015). Otra ventaja de este azúcar es ser una molécula de señalización y antioxidante; por ejemplo, la trehalosa-6-fosfato (T6P) desempeña un papel central en el crecimiento, el desarrollo y la floración de las plantas; asimismo, la T6P regula el metabolismo de los carbohidratos controlando la entrada de glucosa en el proceso de glicólisis (Iturriaga *et al.*, 2009b; Lunn *et al.*, 2014). Otro de los atributos reportado por Bae *et al.*, 2005 es que la trehalosa puede actuar como elicitador de los genes que intervienen en la molécula de desintoxicación y estrés, debido a su propiedad de alterar los niveles de los factores de transcripción, la modificación de la pared celular, el metabolismo del nitrógeno y los genes de la biosíntesis de los ácidos grasos cuando se aplica de manera exógena.

Se han reportado al menos cinco vías biosintéticas de trehalosa en diferentes organismos (Avonce *et al.*, 2006). La vía mejor caracterizada y ampliamente distribuida en la síntesis de trehalosa es la que involucra dos enzimas: trehalosa-6-fosfato sintasa (*TPS*) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (*TPP*). En el primer paso, *TPS* transfiere la glucosa de UDP-glucosa (UDPG) a la glucosa-6-fosfato (G6P) para producir trehalosa-6-fosfato (T6P), que es desfosforilada por *TPP* para producir trehalosa libre en el segundo paso (Avonce *et al.*, 2006; Svanström *et al.*, 2014)(Figura 1).



Esquema 1. Ruta de síntesis de la trealosa en plantas.

Más que ser un camino para producir trealosa; se ha documentado que, en plantas superiores estas enzimas actúan como molécula de señalización que modulan un importante número de procesos metabólicos y desarrollo en las plantas. Un ejemplo de esto, es que el gen *TPS*, juega un papel importante en la síntesis de almidón a través de la actividad redox postraducciona de la pirofosforilasa ADP-glucosa, y en el caso de la enzima *TPP*, puede inhibir la actividad de la proteína quinasa relacionada con Sn1 (SnRK1), que se sabe juega un papel vital en las redes de transcripción relacionadas con estrés en plantas y el metabolismo energético (Wang *et al.*, 2019). De igual forma Satoh-Nagasawa *et al.*, 2006 mostró que la trealosa puede actuar como señal en una ruta de desarrollo, esto debido a que ellos mostraron que la enzima *TPP* puede actuar corriente arriba del factor de transcripción *RA1* para regular la ramificación de la inflorescencia. Diferentes investigaciones se han realizado para estudiar la sobreexpresión de los genes relacionado a la síntesis de trealosa en plantas, con el propósito de aumentar la tolerancia al estrés abiótico en organismos como *Arabidopsis thaliana*, donde se observó un aumento significativo en la tolerancia a la sequía, la salinidad, las heladas y el estrés por calor (Lin *et al.*, 2019; Miranda *et*

al., 2007). Asimismo, Garg y colaboradores en el 2002, clonaron los genes sintéticos fusionados de trealosa *otsA* (*TPS*) y *otsB* (*TPP*) de *E. coli*, en arroz (*Oryza sativa* subsp. Indica var. PB-1) encontrando un aumento en el crecimiento de la planta, menos daño fotooxidativo y un balance mineral más favorable en condiciones de salinidad, sequía y estrés por baja temperatura en líneas transgénicas.

De manera similar, en tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi), Wang y colaboradores en el 2005, mostraron la expresión del gen funcional trealosa-6-fosfato fosfatasa inducido por estrés por calor. En contraste, en *Zea mays* (línea endogámica 18-599), algas marinas (*Porphyra yezoensis*, *Porphyra haitanensis*, *Laminaria japónica*, *Undaria pinnatifid*, *Gracilaria lemaneiformis*, *Sargassum henslowianum*, *Monostroma angicava*, *Ulva pertusa*, *Chondrus ocellatus* y *Enteromorpha prolifera*) árboles (*Ginkgo biloba*) y hongos (*Pleurotus tuoliensis*), fue posible clonar y caracterizar el gen trealosa-6-fosfato sintasa y mostrar su papel en la resistencia al estrés abiótico (Jiang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2018). Sin embargo, muchas de las funciones de los genes *TPS/TPP* son aun en gran medida desconocidas, especialmente aquellos involucrados en las vías de señalización durante el desarrollo de las plantas y la resistencia al estrés. Por lo tanto, la identificación de genes *TPS* y *TPP* es crucial para investigar los mecanismos moleculares dirigidos a combatir el estrés abiótico (Wang *et al.*, 2019). Es por ello que la identificación de los genes *TPS* y *TPP* son cruciales para investigar los mecanismos moleculares no solo, para incrementar nuestro conocimiento y entendimiento de las estrategias sobre el estrés abiótico, sino que también nos permita mejorar la tolerancia de los cultivos mediante la manipulación genética (Abdelgawad *et al.*, 2014).

Por su parte, el maíz es uno de los principales cultivos en todo el mundo, no solo por su importancia tanto en el consumo humano como animal, sino también por sus usos industriales (Martínez-Cruz, 2014). Este cultivo es altamente sensible al estrés abiótico causado por la sequía, la salinidad excesiva y la temperatura extrema, reduciendo el rendimiento hasta en un 7%, alcanzando una pérdida estimada de 16 millones de toneladas de grano, lo que hace necesario implementar estrategias que minimicen las pérdidas causadas por estrés en este cultivo (Porter *et al.*, 2017). Debido a que la trealosa es uno de los osmolitos que, junto con otros compuestos, puede ayudar a estabilizar las proteínas, membranas celulares y puede contribuir a mitigar los daños por estrés abiótico; aunado a que los genes *TPS* y *TPP* en maíz no han sido completamente identificados y estudiados. Este estudio tuvo como objetivo clonar y caracterizar molecularmente los genes *TPS* y *TPP* de plántulas de maíz y evaluar su expresión diferencial bajo estrés por sequía.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamiento de estrés

Se utilizaron dos líneas de semillas de maíz (*Zea mays*) para realizar este trabajo (CML 311) y (CML 551) que fueron categorizada como susceptibles (S) y resistentes (R) a sequía, alta temperatura y bajo nivel de nitrógeno por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, México) quien suministraron el material. Las semillas se germinaron en invernadero utilizando macetas de plástico (15" X 15"), el sustrato estuvo compuesto por perlita, pumicita y peatmoss en una relación 1: 1: 3. Las plantas se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: 12 h de fotoperíodo, 61 % de humedad relativa y 30 ° C.

2.3.2 Tratamientos de riego

Se aplicaron tratamientos de riego a las plantas de maíz en etapa vegetativa V3: El tratamiento (D) de estrés por sequía consistió en mantener las plantas sin riego hasta un 15-20% de su capacidad del campo (CC) y el tratamiento (W) fue con riego regular para mantener a 100% CC. El monitoreo de la humedad se llevó a cabo mediante el pesaje diario durante 72 h. Se tomaron muestras en la tercera hoja de cada repetición a las 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 60 y 72 h, comenzado el tratamiento de sequía (RD y SD), se congelaron en hielo seco y fueron almacenadas a - 70° C. De mismo modo,

muestras de los tratamientos control (RW y SW) fueron recolectadas en los mismos tiempos. Por su parte, todos los tratamientos se realizaron en un diseño factorial completamente al azar 2 x 2 con 12 repeticiones.

2.3.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

ARN total se extrajo de plántulas de *Z. mays* bajo estrés por sequía, así como sus controles, utilizando el protocolo propuesto por Stiekema *et al.*, 1988. La biblioteca de ADNc se construyó mediante transcripción reversa (RT) utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando oligodT. El ADNc se usó como plantilla en la amplificación por PCR y qPCR.

2.3.4 Clonación de los genes que codifican para *TPS/TPP* y análisis de las secuencias

La búsqueda de información en el NCBI mostró varias secuencias predichas y putativas. Para la clonación de los genes, se usaron dos secuencias para amplificar el gen *TPS*: la secuencia putativa con código de acceso en el Genbank NC_024460.2 del gen *TPS4* (*TPS-2*) y la secuencia GU228585.1 del gen *TPS2* (*TPS-3*). Mientras que para *TPP-1* se utilizó la secuencia NM_001158750.1.

Con base en los genes predichos de *TPS/TPP* de maíz, los cebadores fueron diseñados (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y utilizados para amplificar los genes *TPS* y *TPP* del ADNc de maíz. Para el gen *TPS-2* se usaron: F-ATGGTTCTGAAGTCGCACACA y R-TCAGCTGCTTTGTTCCATCTGA, mientras que para el gen *TPS-3*: F-ATGTCGCGGGTGATGACG y R-CTAAGACCCTCCAATTGGTGT. En el caso del gen *TPP-1*, se utilizaron los siguientes primers: F-ATGGATTTGAAGACAGGCCTC y R-TCAGGTGGACTGCTCCTTC con un producto de 1 kb aproximadamente. La PCR se realizó usando el kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA) y los productos amplificados se clonaron en pGEM-T Easy (pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA, Madison, WI, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y secuenciados por servicio externo.

Después de secuenciar y ensamblar las secuencias obtenidas, se hizo un análisis de similitud y búsqueda de dominios utilizando BLAST_X (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de la base de datos NCBI. Para el estudio *in silico*, se utilizó la secuencia aminoacídica, la comparación filogenética se llevó a cabo mediante el algoritmo de máxima verosimilitud usando el programa MEGA 4.0 y la búsqueda de aminoácidos conservados se utilizó las secuencias de genes *TPS* y *TPP* obtenidos; así como, de otros organismos usando Coffemate (<http://tcoffee.crg.cat/>). Igualmente, las secuencias aminoacídicas se usaron para el modelado de las proteínas usando Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) y se

visualizaron en PyMOL, así como también, las estructuras obtenidas se alinearon usando el software Matras.

2.3.5 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

El qPCR se realizó en el termociclador LightCycler 480 utilizando el kit PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix de Applied Biosystem, USA siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la expresión de los genes, un par de cebadores para *TPS-3* (F- AAGTCAAACACAGGGAGTAAG / R- TGTCCTCATCGGACCTATCAT) y *TPP-1* (F- TGGAGATGACAGAACAGATGAAG / R- GCGTCACTCTCTTTTGGGTATAG) y el gen de *18S* ribosómico (F-CTGAGAAACGGCTACCACA / R- CCCAAGGTCCAACACTACGAG) se utilizó como gen endógeno. El protocolo de temperatura fue un ciclo de 120 s a 50°C, seguido de otro ciclo de 120 s a 95°C, 45 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a 60°C y 60 s a 72°C, la fluorescencia se detectó a 72°C. El cambio en la expresión relativa se calculó utilizando el método $2^{\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct \text{ control} = (Ct \text{ gen objetivo} - Ct \text{ gen de referencia})$, para después ser normalizado utilizando el gen control endógeno $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ tratado} - \Delta Ct \text{ no tratado})$ y finalmente la expresión diferencial de los genes *TPS* y *TPP* fue calculados y representados mediante Log 2.

2.3.6 Análisis estadístico

Los resultados del qPCR fueron reportados como $\text{Log}_2 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$. La diferencia estadística entre los niveles de expresión fue analizada mediante ANOVA unidireccional, y las medias de tratamiento fueron comparadas con una Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando Excel 2016 y el paquete estadístico SPSS versión 25.

2.4 Resultados

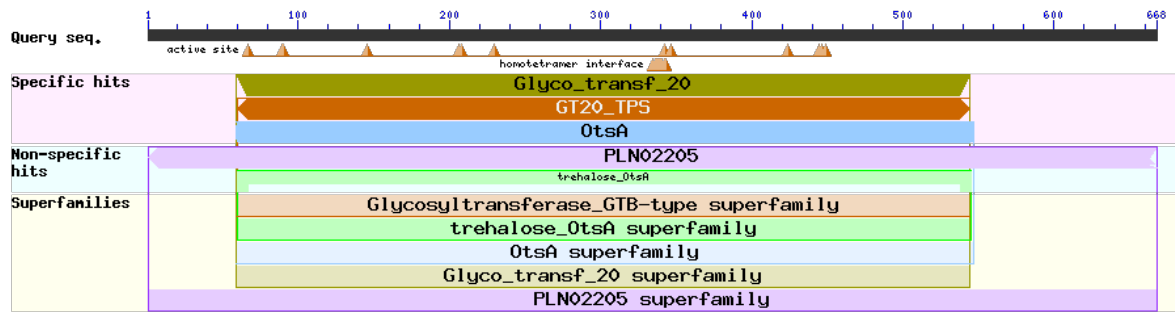
2.4.1 Clonación y caracterización de ADNc de *TPS* y *TPP*

Los análisis por PCR mostraron dos fragmentos amplificados de *TPS*, un fragmento de 2,006 pb nombrado gen *TPS-2* y un fragmento de 2,625 pb etiquetado como gen *TPS-3*. En el caso de *TPP*, se obtuvo un amplicón de 1,145 pb, que se nombró *TPP-1*. Los fragmentos de PCR se clonaron en pGEM-T Easy, y los plásmidos se denominaron pAP2 y pAP3 para las isoformas de *TPS-2* y *TPS-3* y pAP5 para la variante *TPP-1*, respectivamente. Finalmente, todos los plásmidos se secuenciaron y los resultados se analizaron utilizando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

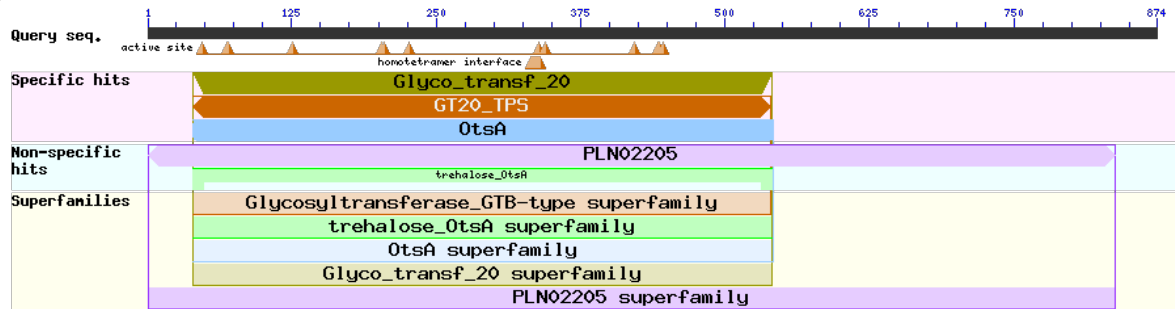
2.4.2 Análisis de secuencias de aminoácidos y relación filogenética de los genes *TPS*

El análisis de secuencias nucleotídicas mostró un marco de lectura abierta (ORF) que codifica una proteína de 608 aminoácidos con un peso molecular teórico de 76.23 kDa para *TPS-2*, mientras que *TPS-3* mostró un ORF de 874 aminoácidos y un peso supuesto de 97.39 kDa. El análisis de las secuencias de aminoácidos reveló que estas dos proteínas (*TPS-2* y *TPS-3*) tienen dos dominios que corresponden a las familias de las glicosiltransferasa 20 y GT20_*TPS*. En este caso, la glicosiltransferasa está relacionada con la catálisis y la posterior síntesis de α , α -1,1-trehalosa-6-fosfato, utilizando UDP-glucosa como donante (Figura 1a).

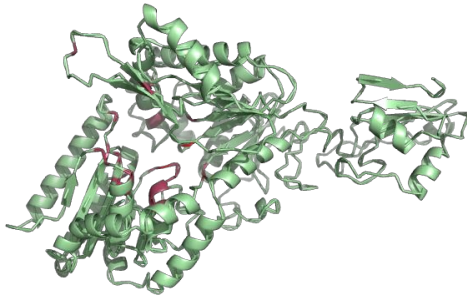
a



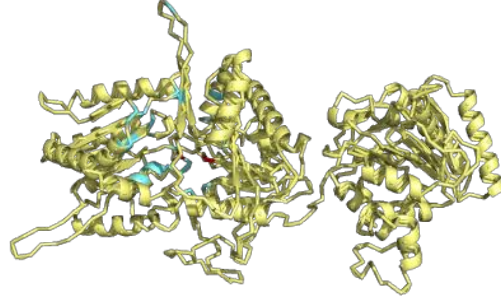
b



c



d



e

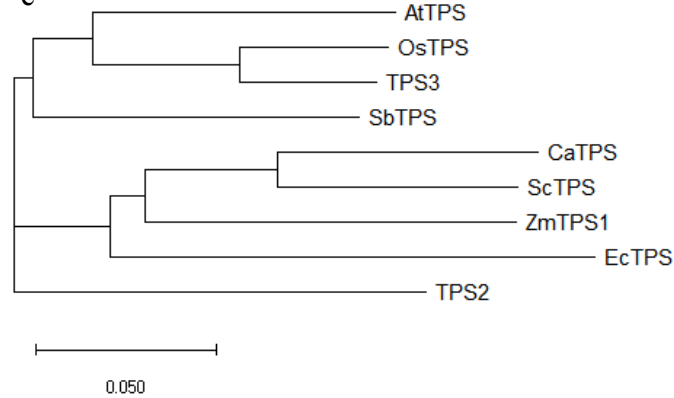


Figura 1. Análisis de secuencia de aminoácidos y relación filogenética de los genes *TPS-2* y *TPS-3*: (a) Análisis de dominios de los genes *TPS-2*; (b) Análisis de dominios de los genes *TPS-3*; (c) Modelado computacional de la estructura en cinta de la proteína *TPS-2*; (d) Modelado computacional de gen *TPS-3*; (e) Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de *TPS-2* y *TPS-3*.

Con respecto a los análisis de secuencia de aminoácidos entre *TPS-2* y *TPS-3*, se detectó una similitud entre ellas de 53,5%. El modelado computacional de ambas proteínas mostró una similitud del 92% entre las dos estructuras secundarias y un DRMS de 9.22 Å entre ambas (Figura 1c, d).

Se realizó un alineamiento múltiple de las proteínas reportada aquí contra las reportadas en otros organismos. En comparación con otros, *TPS-2* tenía una identidad del 89% con la secuencia *AtTPS* (*Arabidopsis thaliana*, NP_172129.1), 89% con *OsTPS* (*Oryza sativa*, AEB53178.1), 88% con *SbTPS* (*Sorghum bicolor*, XP_021308880 .1) y 85% con *ZmTPS* (*Zea mays*, B4FVF6). Mientras que, *TPS-3* mostró 92% de identidad con *AtTPS*, 91% con *SbTPS*, una identidad de 92% con secuencia *OsTPS* y 88% con lo reportado en *Zea mays* (*ZmTPS*). Además, se realizó un análisis filogenético, donde se destaca que *TPS-3* tiene una similitud evolutiva más reciente en comparación con *TPS-2* y otras especies como sorgo (*SbTPS*), *Arabidopsis* (*AtTPS*) y arroz (*OsTPS*) (Figura 1e).

2.4.5 Análisis de secuencia de aminoácidos y relación filogenética de los genes

TPP

En el caso de *TPP-1*, se encontró un ORF que codifica una proteína de 381 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 42.21 kDa, y presentó un dominio de trehalosa-PPasa. Además, se realizó el modelado computacional de esta secuencia de aminoácidos (Figura 2a, b).

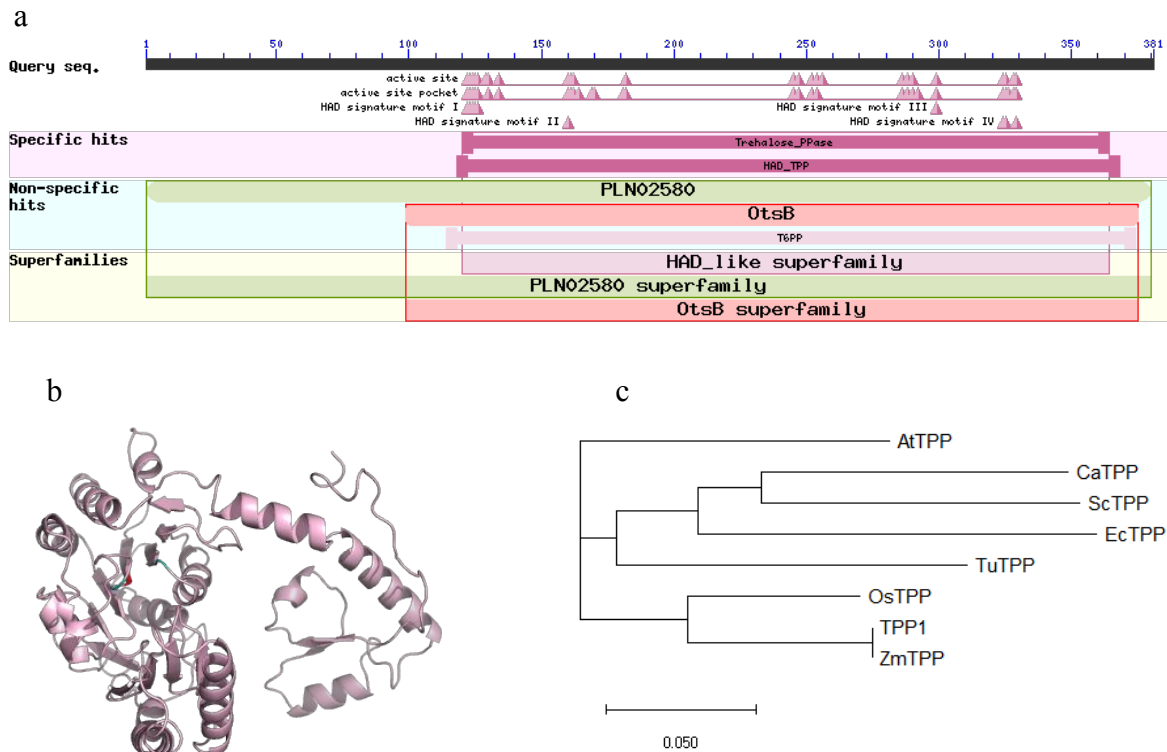


Figura 2. Análisis de secuencia de aminoácidos y relación filogenética del gen *TPP-1*:

(a) Análisis de búsqueda de dominios para el gen *TPP-1*; (b) Modelado computacional de la proteína *TPP-1*; (c) Árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos de *TPP*.

Con respecto a la comparación con otras secuencias de *TPP* de diferentes especies, Se observó una similitud del 82% respecto a lo descrito en *Zea mays* (*ZmTPP*, B4FVF6), 81% de similitud con lo reportado en *Oryza sativa* (*OsTPP*, Q9FWQ2), 80% *Triticum aestivum* (*TaTPP*, EMS61117. 1) y 78% con el encontrado en *Arabidopsis thaliana* (*AtTPP*, Q9SU39). El análisis filogenético mostró que *TPP-1*, *ZmTPP* y *OsTPP* presentaban, en un aspecto evolutivo, una relación más estrecha y una similitud estructural a diferencia de otras especies, por lo que probablemente derivan del mismo ancestro (Figura 2c).

2.4.6 Análisis *in silico* de sitios catalíticos

El análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos reveló que estas dos proteínas (*TPS-2* y *TPS-3*) comparten la misma estructura y ubicación del sitio activo. Así mismo, se encontraron residuos altamente conservados como trp40, tyr76, trp85 y arg300, que están asociados a los sitios de unión con glucosa-6-fosfato y los aminoácidos asp¹³⁰, his¹⁵⁴, arg²⁶² y asp³⁶¹ que están involucrados en los sitios de unión a UDP-glucosa, además de los aminoácidos del sitio catalítico his¹⁵⁴ y asp³⁶ (Figura 3a; b). Así mismo, tanto *TPS-2* como *TPS-3* tienen un 92% y 93% de similitud, respectivamente, a la secuencia aminoacídica con otras secuencias de *TPS* funcionales en esta región como: *AtTPS*, *SbTPS*, *OsTPS*, *ZmTPS*, *ScTPS* (*Saccharomyces cerevisiae*, NP_009684.1), *CaTPS* (*Candida albicans*, XP_711706.1) y *EcTPS* (*Escherichia coli*, P31677) (Figura 3c).

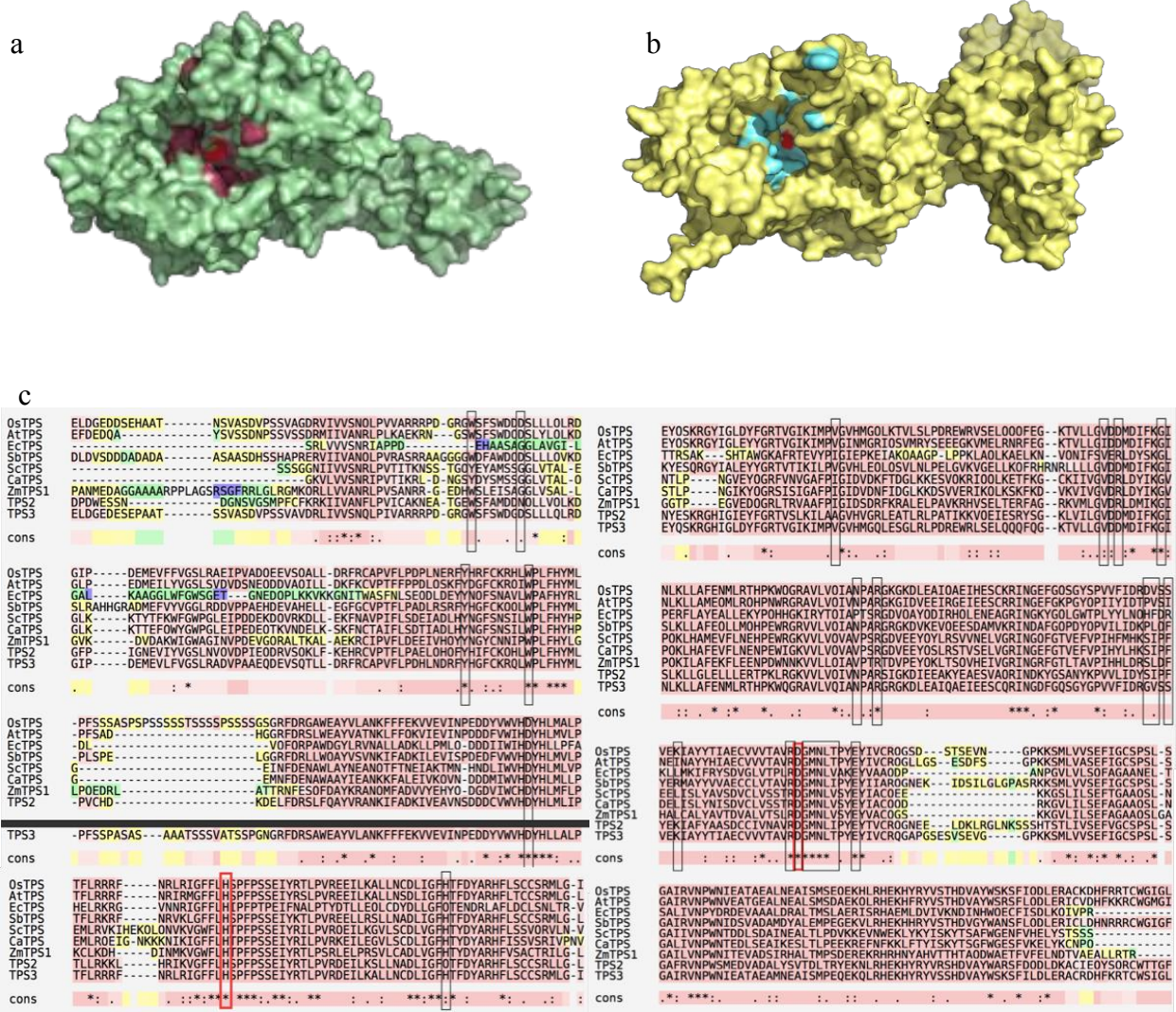


Figura 3. Análisis *in silico* de sitios catalíticos de los genes *TPS*: (a) Modelo de proteína *TPS-2* con los sitios catalíticos; (b) proteína *TPS-3* con la ubicación del sitio activo; (c) Alineamientos múltiples de la secuencia de aminoácidos de *TPS-2* y *TPS-3* con otras proteínas *TPS* funcionales de otras especies.

Por otro lado, *TPP-1* presentó 80% de similitud a otros *TPP* de diferentes organismos previamente reportados, como *TaTPP*, *ZmTPP*, *OsTPP*; *AtTPP*,

ScTPP de (*Saccharomyces cerevisiae*, CAA50025.1), *CaTPP* de (*Candida albicans*, XP_721536.1) y *EcTPP* de (*Escherichia coli*, P31678). En el caso de la secuencia de aminoácidos *TPP-1*, se encontró la presencia de los aminoácidos conservados: asp²⁰, asp²² y asp¹⁹⁸, que están relacionados con los sitios de unión al sustrato y el sitio catalítico; los aminoácidos asp²⁰, leu²¹ y asp²² que están relacionados a los sitios de unión al sustrato y el asp²⁰ al sitio activo. (Figura 4a, b).

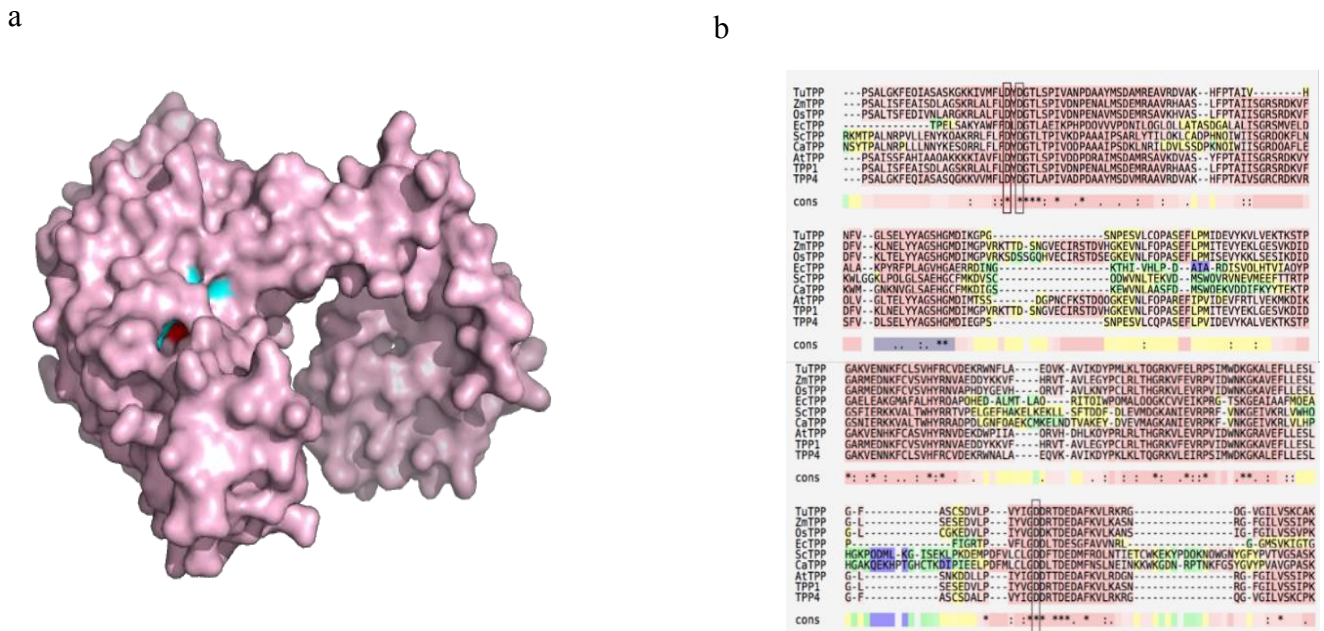


Figura 4. Análisis *in silico* de sitios catalíticos del gen *TPP*: (a) Modelo de proteína *TPP-1* con los sitios catalíticos; (b) Alineamientos de los dominios *TPP* de *TPP-1* junto con otras proteínas *TPP* funcionales de diferentes especies.

2.4.7 PCR cuantitativa en tiempo real

Se determinó el nivel de expresión relativa de los genes *TPS-3* y *TPP-1* en los tejidos de plántulas resistentes y susceptibles en respuesta a sequía. En el caso de la expresión del gen *TPS-3*, las plántulas resistentes aumentaron significativamente durante los primeros 30 min y de nuevo dos horas más tarde, para disminuir a niveles normales desde cuatro horas hasta 72 h. En las plántulas susceptibles, en cambio, hubo un aumento en la expresión de la *TPS-3* desde las dos horas hasta seis horas, y luego una disminución de la expresión hasta las 12 h después de comenzado el estrés. Finalmente, este gen aumento nuevamente a las 24 h a 60 h en condiciones de estrés (Figura 5a). En la expresión del gen *TPP-1* en plantas resistentes, hubo una alta inducción en la primera hora, para luego disminuir 12 h después del estrés de sequía. A partir de las 18 h se elevó la expresión de manera continua. Por otro lado, el gen *TPP-1* en las plántulas susceptibles se incrementó desde la primera hora hasta la cuarta y disminuyó hasta 12 h después de iniciar el tratamiento de estrés. Luego, el nivel de expresión aumentó desde las 18 h hasta el final del experimento (Figura 5b).

El análisis estadístico mostró una alta correlación entre los dos factores principales: el genotipo y la expresión de los genes ($p \leq 0.05$) en ambos casos durante el tiempo del experimento, encontrando que la expresión de estos genes podría estar relacionada con el genotipo. Se observó que en el caso de la expresión de la *TPS-3* hubo diferencia estadística entre las líneas utilizadas

a las 0.5, 4, 6, 8, 10, 12, 72 horas, siendo el genotipo resistente el que mostró un comportamiento más irregular en comparación con las plantas susceptibles. De la misma manera, en el caso de la expresión del gen *TPP-1* se observó una diferencia significativa entre los genotipos a las 0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 48 y 60 horas. Los datos mostraron que la línea resistente tenía mayores niveles de expresión en estas horas a diferencia de lo que se observó en las plantas susceptibles.

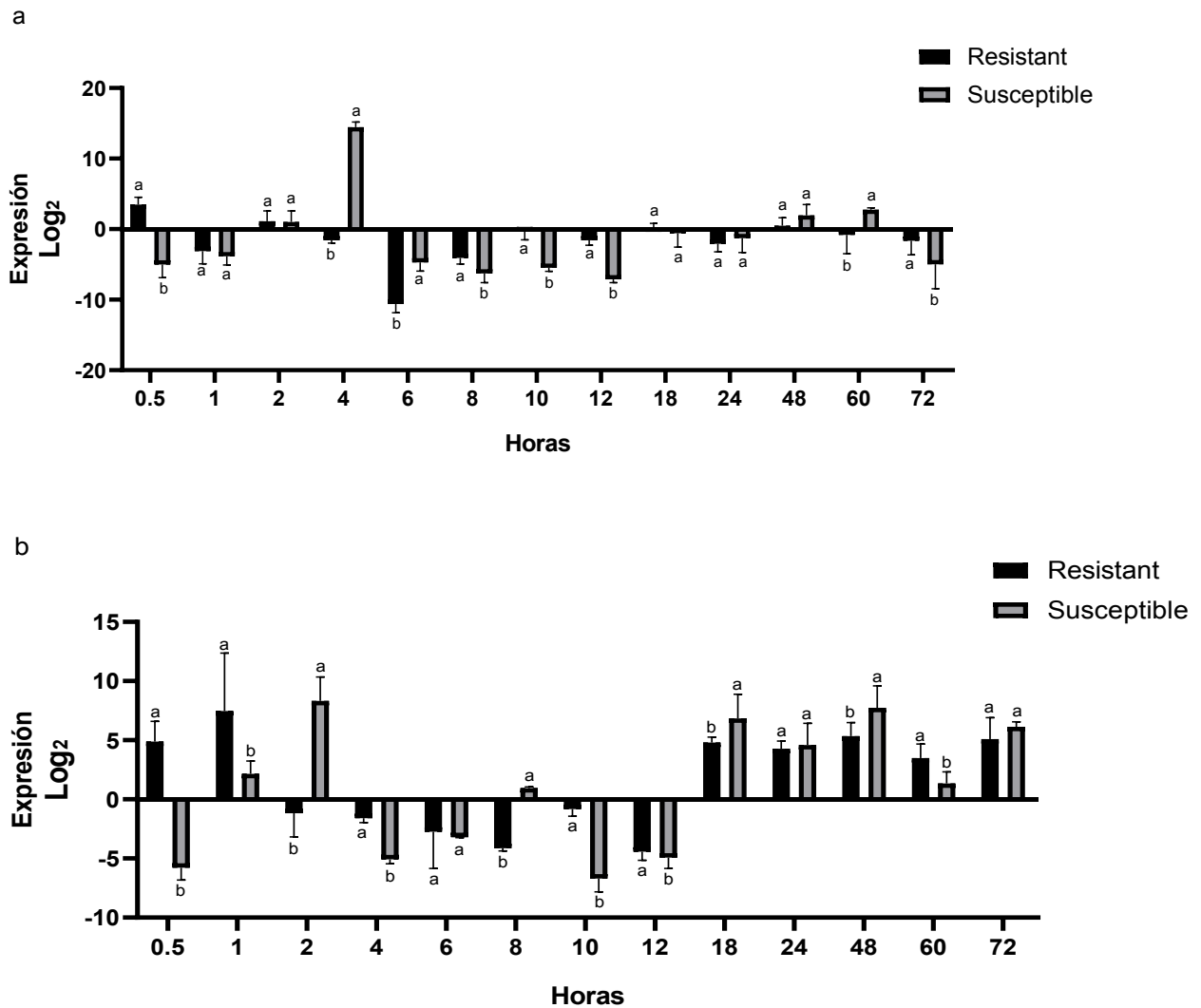


Figura 5. Resultados cuantitativos en tiempo real del cambio en la expresión de los genes *TPS-3* y *TPP-1* en plántulas de maíz (*Zea mays*) resistentes y susceptibles sometidas a estrés por sequía. Los datos de expresión fueron reportados como $\text{Log}_2(-\Delta\Delta\text{Ct})$, el aumento en la expresión toma un valor positivo mientras que la disminución en la expresión es negativa, esto comparado con la expresión de las plántulas con riego. Los valores son la media \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las líneas en el mismo período de tiempo ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey:

a) Expresión relativa del gen *TPS-3* en hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles; b) Expresión relativa del gen *TPP-1* en hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles.

2.8 Discusión

El estrés hídrico, así como otros tipos de estrés abiótico, afecta el comportamiento de la planta de diferentes maneras: genética, transcriptómica, proteómica, metabólica y fisiológicamente. En las plantas, el crecimiento apenas se ve afectado a niveles de bajo estrés y en el caso del maíz, el estrés abiótico inhibe el crecimiento de raíces tanto en estrés alto como en el bajo. Así mismo, el número y el tamaño de las hojas y la altura de la planta de maíz se ven afectados bajo estrés por sequía mucho más que el crecimiento de las raíces (Khan *et al.*, 2015; Nayyar y Gupta, 2006).

La trealosa es un osmolito compatible que ha demostrado la capacidad de proteger el organismo contra el estrés por sequía en diferentes especies y su principal vía biosintética, la *TPS-TPP* se ha estudiado ampliamente. En este estudio, dos genes *TPS* y un gen *TPP* fueron identificados en *Zea mays*. Los ADNc de *TPS* y *TPP* clonados mostraron que los genes *TPS-2* y *TPS-3* contiene los dominios Glyco_transf_20 y GT20, y el gen *TPP-1* contiene el dominio Trehalose_PPase. Estos resultados fueron similares a los expuestos por Wang *et al.*, 2019 en que los genes *BdTPS* y *BdTPP* aislados mostraron este tipo de dominios, que están relacionados con la actividad de estas enzimas. Por otra parte, el análisis del aminoácido mostró una alta homología en comparación cuando fueron comparados contra otros organismos. La alineación de las secuencias de proteínas *TPS* y *TPP* de bacterias, levaduras y plantas demostró residuos altamente conservados involucrados en la unión del sustrato y el sitio activo (Gibson *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2010; Kosmas *et al.*, 2006;

Tang *et al.*, 2010). La mayoría de los dominios conservados de estas proteínas están involucrados en la unión enzima-sustrato y el sitio activo para la síntesis de la trehalosa-6-fosfato. Aunque la estructura terciaria de ambas proteínas, *TPS-2* y *TPS-3*, es visualmente diferente, comparten los mismos sitios catalíticos. Este resultado concuerda con lo mencionado por Gibson *et al.*, 2002 y Jiang *et al.*, 2010, quienes observaron que todas las proteínas *TPS* funcionales conocidas en plantas se han conservado estos aminoácidos.

Referente a la expresión relativa de los genes, *TPS-3* y *TPP-1*, se indujeron significativamente después del estrés. Este comportamiento puede estar relacionado a su participación en la respuesta al estrés por sequía.. Recientemente, el metabolismo de la trealosa se ha relacionado con la tolerancia al estrés y algunos experimentos han indicado el rol de los genes *TPS* en el aumento de la tolerancia al estrés (Kaasen *et al.*, 1994b). Respecto a la expresión de los genes *TPS*, resultados fueron similares a los reportados por Jiang *et al.*, 2010 quienes mencionaron que la expresión del gen *TPS* en el maíz aumenta su regulación en las primeras horas iniciado un proceso de estrés por sequía. Asimismo, los resultados mostrados por Wang *et al.*, 2019 mostraron que los niveles de expresión de algunos genes de *TPS* aislados aumentaron bajo diferentes tipos de estrés abiótico como el frío, la salinidad y el estrés por sequía en las primeras tres horas. Además, el autor menciona que estos patrones de expresión pueden conectarse con varios aspectos de las tolerancias al estrés abiótico. De la misma manera, este comportamiento también puede deberse a la inducción por Ca^{+} en el citoplasma celular; el cual, sirve como una molécula de señal secundaria intracelular que estimula la acumulación de osmolitos compatibles como la trealosa

(Knight, 1999; Sanders *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2006b). Así como también, a la necesidad de una acumulación de trealosa, el mantenimiento de la expresión de genes para así mantener este osmoprotector en niveles bajos (Nuccio *et al.*, 2015).

Otro estudio del gen *TPS* en *Arabidopsis* por Avonce, 2004 sugiere una interacción entre la expresión de *TPS* y el metabolismo ABA. Teniendo un papel como un segundo mensajero, lo que puede explicar el rápido cambio en la regulación frente al estrés abiótico. Al respecto de la expresión de *TPP*, se demostró un aumento en los niveles de expresión de *TPP* en las primeras dos horas, observándose una respuesta más rápida en la planta resistente, a diferencia de la susceptible. Esta respuesta fue similar a la obtenida por Ge *et al.*, 2008, quienes observaron una regulación positiva del gen *TPP* en arroz en la primera hora de estrés, así como también la expresión relativa del gen *BdTPPC* que presento un aumento de la misma una hora después de estar expuesta a estrés abiótico. La sobreexpresión del gen *TPP* se ha documentado en las etapas de floración en el maíz y se ha demostrado su relación con la mejora del rendimiento durante el estrés por sequía (Nuccio *et al.*, 2015), así como también, Satoh-Nagasawa *et al.*, 2006 mostró que la trealosa puede actuar como señal en una ruta de desarrollo, esto debido a que ellos mostraron que la enzima *TPP* puede actuar corriente arriba del factor de transcripción *RA1* para regular la ramificación de la inflorescencia. En este estudio se observó que las plantas resistentes mostraron una respuesta más rápida que susceptible, lo que sugiere la participación de estos genes en la tolerancia a la sequía. Además, debido a que *TPS* / *TPP* puede responder a ABA, y los elementos que responden a ABA (ABRE), es posible que los genes *TPS* y *TPP*

pueden estar vinculados para responder a una deshidratación por parte de la planta, realzando su participación en la vía de señalización de ABA (Wang *et al.*, 2019).

2.9 Conclusiones

Actualmente, el cambio climático afecta negativamente a las plantas; por lo que, estas tienen que utilizar diferentes estrategias para mantener la integridad de los diferentes compuestos dentro célula. En este sentido, la comprensión de los mecanismos que rigen la adaptación de las plantas al estrés permitirá el diseño de estrategias que mejoren la producción y así aumentar su rendimiento. En esta investigación, clonamos los genes *TPS* y *TPP* de plántulas de maíz y descubrimos que estos genes se expresan diferencialmente bajo estrés por sequía. El análisis mostró que el maíz tiene diferentes enzimas para la producción de trealosa, que comparten un alto grado de conservación de los residuos presentes en sus sitios catalíticos, los cuales, hace que tenga una alta similitud a otras *TPS* y *TPP* funcionales de otros organismos.

Este estudio presentó información relevante sobre las diferentes isoformas de *TPS* y *TPP* que pueden ser expresadas en el maíz, sin embargo, es necesario realizar investigaciones adicionales sobre la participación de estos genes; así como otros compuestos, que están involucrados en las vías de señalización que activan diferentes mecanismos moleculares relacionados con conferir tolerancia al estrés abiótico en las plantas.

2.10 Bibliografía

- Abdelgawad, Z., Hathout, T., El-Khallal, S., Said, E., Al-Mokadem, A., & others. (2014). Accumulation of trehalose mediates salt adaptation in rice seedlings. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 14(12), 1450–1463.
- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, 47(3), 411-414. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83932-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83932-1)
- Avonce. (2004). The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Absciscic Acid, and Stress Signaling. *PLANT PHYSIOLOGY*, 136(3), 3649-3659. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052084>
- Avonce, Mendoza-Vargas, A., Morett, E., & Iturriaga, G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-109>
- Bae, H., Herman, E., Bailey, B., Bae, H.-J., & Sicher, R. (2005). Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiologia Plantarum*, 125(1), 114-126. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00537.x>
- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., De Virgilio, C., Wiemken, A., & Thevelein, J. M. (1998). Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33311-33319.

- Bhandal, I. S., Hauptmann, R. M., & Widholm, J. M. (1985). Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. *Plant physiology*, 78(2), 430–432.
- Chang, S.-W., Chang, W.-H., Lee, M.-R., Yang, T.-J., Yu, N.-Y., Chen, C.-S., & Shaw, J.-F. (2010a). Simultaneous production of trehalose, bioethanol, and high-protein product from rice by an enzymatic process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2908-2914. <https://doi.org/10.1021/jf903382e>
- Chang, S.-W., Chang, W.-H., Lee, M.-R., Yang, T.-J., Yu, N.-Y., Chen, C.-S., & Shaw, J.-F. (2010b). Simultaneous Production of Trehalose, Bioethanol, and High-Protein Product from Rice by an Enzymatic Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2908-2914. <https://doi.org/10.1021/jf903382e>
- Chen, H., & Jiang, J.-G. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, 18(NA), 309-319. <https://doi.org/10.1139/A10-014>
- Chen, T. H. H., & Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: Mechanisms and biotechnological applications: Glycinebetaine against abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 34(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02232.x>
- Cruz, M., & others. (2014). *Cultivo in vitro mediante embriogénesis somática y transfromación genética de maíz (Zea mays L.) con genes de biosíntesis de trehalosa/por Esbeydi Martínez Cruz*. Universidad Autonoma de Chapingo.
- Drennan, P. M., Smith, M. T., Goldsworthy, D., & van Staden, J. (1993). The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus*

- flabellifolius welw. *Journal of Plant Physiology*, 142(4), 493-496.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81257-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81257-5)
- Elbein, A. D. (1974). The metabolism of α , α -trehalose. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 30, 227–256.
- Garg, A. K., Kim, J.-K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Choi, Y. D., Kochian, L. V., & Wu, R. J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15898-15903. <https://doi.org/10.1073/pnas.252637799>
- Ge, L.-F., Chao, D.-Y., Shi, M., Zhu, M.-Z., Gao, J.-P., & Lin, H.-X. (2008). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta*, 228(1), 191–201.
- Gibson, R. P., Lloyd, R. M., Charnock, S. J., & Davies, G. J. (2002). Characterization of *Escherichia coli* OtsA, a trehalose-6-phosphate synthase from glycosyltransferase family 20. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(2), 349–351.
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21(6), 535-553.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x>
- Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 377–403.
- Iturriaga, G., Suárez, R., & Nova-Franco, B. (2009a). Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 3793–3810.

- Iturriaga, G., Suárez, R., & Nova-Franco, B. (2009b). Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 3793–3810.
- Jiang, W., Fu, F.-L., Zhang, S.-Z., Wu, L., & Li, W.-C. (2010). Cloning and Characterization of Functional Trehalose-6-Phosphate Synthase Gene in Maize. *Journal of Plant Biology*, 53(2), 134-141. <https://doi.org/10.1007/s12374-010-9098-7>
- Kaasen, I., McDougall, J., & Strøm, A. (1994a). Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in Escherichia coli and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*, 145(1), 9–15.
- Kaasen, I., McDougall, J., & Strøm, A. R. (1994b). Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in Escherichia coli and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*, 145(1), 9-15. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90316-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90316-6)
- Khan, M. B., Hussain, M., Raza, A., Farooq, S., & Jabran, K. (2015). Seed priming with CaCl₂ and ridge planting for improved drought resistance in maize. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(2), 193–203.
- Klähn, S., & Hagemann, M. (2011). Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria: Cyanobacterial solutes. *Environmental Microbiology*, 13(3), 551-562. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02366.x>

- Knight, H. (1999). Calcium Signaling during Abiotic Stress in Plants. En *International Review of Cytology* (Vol. 195, pp. 269-324). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62707-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62707-2)
- Kosmas, S. A., Argyrokastritis, A., Loukas, M. G., Eliopoulos, E., Tsakas, S., & Kaltsikes, P. J. (2006). Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta*, 223(2), 329-339. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0071-5>
- Lee, J., De Gryze, S., & Six, J. (2011). Effect of climate change on field crop production in California's Central Valley. *Climatic Change*, 109(1), 335–353.
- Lin, Q., Yang, J., Wang, Q., Zhu, H., Chen, Z., Dao, Y., & Wang, K. (2019). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase family gene AtTPPF improves the drought tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 19(1), 381. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1986-5>
- Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Van Dijck, P., & Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 544-567.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12509>
- Ma, C., Wang, Z., Kong, B., & Lin, T. (2013). Exogenous trehalose differentially modulate antioxidant defense system in wheat callus during water deficit and subsequent recovery. *Plant Growth Regulation*, 70(3), 275-285.
<https://doi.org/10.1007/s10725-013-9799-2>
- Martinez-Cruz, E. (2014). *Cultivo in vitro mediante embriogénesis somática y transformación genética de maíz (Zea mays L.) con genes de biosíntesis de*

- trehalosa* [Tesis Doctoral, Universidad Autonoma Chapingo].
<https://chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISDCH2014063009127253.pdf>
- Meza, F. J., & Silva, D. (2009). Dynamic adaptation of maize and wheat production to climate change. *Climatic Change*, 94(1-2), 143-156.
<https://doi.org/10.1007/s10584-009-9544-z>
- Miranda, J. A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J. M., Van Dijck, P., & Iturriaga, G. (2007). A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 226(6), 1411-1421. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0579-y>
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2015). Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: Oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Protoplasma*, 252(2), 461-475. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0691-3>
- Nayyar, H., & Gupta, D. (2006). Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 58(1-3), 106-113.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.021>
- Nuccio, M. L., Wu, J., Mowers, R., Zhou, H.-P., Meghji, M., Primavesi, L. F., Paul, M. J., Chen, X., Gao, Y., Haque, E., Basu, S. S., & Lagrimini, L. M. (2015). Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. *Nature Biotechnology*, 33(8), 862-869.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3277>

- Park, J. K., Jung, J. Y., & Park, Y. H. (2003). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters*, 25(24), 2055-2059.
- Patist, A., & Zoerb, H. (2005a). Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40(2), 107–113.
- Patist, A., & Zoerb, H. (2005b). Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40(2), 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.05.003>
- Porter, J. R., Xie, L., Challinor, A. J., Cochrane, K., Howden, S. M., Iqbal, M. M., Travasso, M., Barros, V., Field, C., Dokken, D., & others. (2017). *Food security and food production systems*.
- Rao, K. M., Raghavendra, A., & Reddy, K. J. (2006). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer Science & Business Media.
- Roser, B. (1991). Trehalose drying-A novel replacement for freeze-drying. *Biopharm- the Technology & Business of Biopharmaceuticals*, 4(8), 47–52.
- Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J. F. (1999). Communicating with Calcium. *The Plant Cell*, 11(4), 691-706. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.691>
- Satoh-Nagasawa, N., Nagasawa, N., Malcomber, S., Sakai, H., & Jackson, D. (2006). A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature*, 441(7090), 227-230. <https://doi.org/10.1038/nature04725>
- Schiraldi, C., Di Lernia, I., & De Rosa, M. (2002). Trehalose production: Exploiting novel approaches. *TRENDS in Biotechnology*, 20(10), 420–425.
- Stiekema, W. J., Heidekamp, F., Dirkse, W. G., van Beckum, J., de Haan, P., Bosch, C. ten, & Louwerse, J. D. (1988). Molecular cloning and analysis of four potato

- tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 11(3), 255-269.
<https://doi.org/10.1007/BF00027383>
- Suárez, R., Calderón, C., & Iturriaga, G. (2009). Enhanced Tolerance to Multiple Abiotic Stresses in Transgenic Alfalfa Accumulating Trehalose. *Crop Science*, 49(5), 1791. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.09.0573>
- Sussich, F., Urbani, R., Princivale, F., & Cesàro, A. (1998). Polymorphic amorphous and crystalline forms of trehalose. *Journal of the American Chemical Society*, 120(31), 7893–7899.
- Svanström, V.A., van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J., & Melin, P. (2014). Trehalose synthesis in *Aspergillus niger*: Characterization of six homologous genes, all with conserved orthologs in related species. *BMC microbiology*, 14(1), 90.
- Tang, B., Chen, J., Yao, Q., Pan, Z., Xu, W., Wang, S., & Zhang, W. (2010). Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *Journal of Insect Physiology*, 56(7), 813-821. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.02.009>
- Tao, F., Zhang, Z., & Yokozawa, M. (2011). Dangerous levels of climate change for agricultural production in China. *Regional Environmental Change*, 11(1), 41–48.
- Villers-Ruiz, L., & Trejo-Vázquez, I. (1997). Assessment of the vulnerability of forest ecosystems to climate change in Mexico. *Climate Research*, 9(1-2), 87–93.
- Wang, G., Zhao, G., Feng, Y., Xuan, J., Sun, J., Guo, B., Jiang, G., Weng, M., Yao, J., Wang, B., Duan, D., & Liu, T. (2010). Cloning and Comparative Studies of Seaweed Trehalose-6-Phosphate Synthase Genes. *Marine Drugs*, 8(7), 2065-2079. <https://doi.org/10.3390/md8072065>

- Wang, S., Ouyang, K., & Wang, K. (2019). Genome-Wide Identification, Evolution, and Expression Analysis of TPS and TPP Gene Families in *Brachypodium distachyon*. *Plants*, 8(10), 362. <https://doi.org/10.3390/plants8100362>
- Wang, Y.-J., Hao, Y.-J., Zhang, Z.-G., Chen, T., Zhang, J.-S., & Chen, S.-Y. (2005). Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells. *Journal of Plant Physiology*, 162(2), 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.06.014>
- Wingler, A. (2002). The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, 60(5), 437-440. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00137-1)
- Woodruff, P. G., Dolganov, G. M., Ferrando, R. E., Donnelly, S., Hays, S. R., Solberg, O. D., Carter, R., Wong, H. H., Cadbury, P. S., & Fahy, J. V. (2004). Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 169(9), 1001–1006.
- Wu, W., Pang, Y., Shen, G.-A., Lu, J., Lin, J., Wang, J., Sun, X., & Tang, K. (2006a). Molecular Cloning, Characterization and Expression of a Novel Trehalose-6-phosphate Synthase Homologue from *Ginkgo biloba*. *BMB Reports*, 39(2), 158-166. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2006.39.2.158>
- Wu, W., Pang, Y., Shen, G.-A., Lu, J., Lin, J., Wang, J., Sun, X., & Tang, K. (2006b). Molecular Cloning, Characterization and Expression of a Novel Trehalose-6-phosphate Synthase Homologue from *Ginkgo biloba*. *BMB Reports*, 39(2), 158-166. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2006.39.2.158>

- Wu, X., Hou, Z., Huang, C., Chen, Q., Gao, W., & Zhang, J. (2018). Cloning, purification and characterization of trehalose-6-phosphate synthase from *Pleurotus tuoliensis*. *PeerJ*, 6, e5230. <https://doi.org/10.7717/peerj.5230>
- Yancey, S. B., Edens, J. E., Trosko, J. E., Chang, C.-C., & Revel, J.-P. (1982). Decreased incidence of gap junctions between Chinese hamster V-79 cells upon exposure to the tumor promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Experimental cell research*, 139(2), 329–340.
- Yohannes, H. (2016). A review on relationship between climate change and agriculture. *JOURNAL OF EARTH SCIENCE & CLIMATIC CHANGE, RESEARCH*. <http://worldveg.tind.io/record/56985>
- Zhou, Y., Li, N., Dong, G., & Wu, W. (2013). Impact assessment of recent climate change on rice yields in the Heilongjiang Reclamation Area of north-east China. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2698–2706.

CAPITULO 2. EVALUACIÓN FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA EN PLÁNTULAS DE MAÍZ (*Zea mays*) BAJO ESTRÉS OSMÓTICO Y EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES PRECURSORES DE TREALOSA: TREALOSA-6-FOSFATO SINTASA Y TREHALOSA-6-FOSFATO FOSFATASA

3.1 Resumen

El estrés osmótico es uno de los tipos de estrés abiótico más serios que puede afectar directamente el crecimiento de las plantas, el proceso de diversas rutas metabólicas y el rendimiento del cultivo. Por dicha razón, las plantas utilizan diferentes estrategias para mitigar el daño producido por la acumulación de sales, como puede ser la generación de osmolitos compatibles como la trealosa; el cuál ha mostrado su participación como mecanismo de tolerancia a estrés abiótico en muchos organismos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los cambios fenotípicos, bioquímicos, fisiológicos y niveles de plántulas de dos líneas de maíz (*Zea mays*) con fenotipos susceptibles y resistentes CML 311 y CML 551 respectivamente; bajo tres niveles de salinidad (0, 30 y 60 mM de NaCl) y analizar la expresión diferencial de los genes *TPS/TPP* precursores de trealosa bajo estas condiciones de estrés. En la mayoría de los casos se observó un incremento en el número de hojas, altura de planta, pigmentos fotosintéticos, estabilidad de membrana celular, azúcares totales, prolina y las enzimas antioxidantes SOD, POD, APX y CAT. El análisis de expresión relativa por RT-qPCR mostró expresión diferencial a diferentes tiempos de ambos genes *TPS* y *TPP*, presentándose una inducción significativa después de 0,5 h para líneas resistentes y después de 6 h en la mayoría de los casos en las plantas susceptibles.

3.2 Introducción

La salinidad en la agricultura ha sido un importante factor restrictivo en la producción de alimento debido a que restringe el uso de la tierra y limita el rendimiento de los cultivos. Se calcula que aproximadamente el 20% de las tierras agrícolas y el 50% de las tierra cultivable en el mundo están sometidas a estrés salino (Rana Munns y Tester, 2008).

El crecimiento y desarrollo de las plantas se ve afectado por el estrés por salinidad a través de: 1) bajo potencial osmótico de la solución del suelo (estrés hídrico), 2) desequilibrio nutricional, 3) efecto específico (estrés salino) o 4) combinación de estos factores (Ashraf, 2004). Durante el inicio y desarrollo del estrés salino dentro de una planta, todos los procesos principales como la fotosíntesis, la síntesis de proteínas y el metabolismo energético y lipídico se ven afectados; un ejemplo de esto es que los sistemas enzimáticos de la glicólisis, ciclo de Krebs y la fotofosforilación son especialmente sensibles a las soluciones salinas, y dan como resultado una menor disponibilidad de energía, adquisición de nutrientes y una disminución del crecimiento de la planta y germinación de la semilla (Larcher, 2003). En respuesta al estrés la planta activa diferentes mecanismos para equilibrar la hiperosmolaridad celular y el desequilibrio iónico (Ahmad *et al.*, 2013).

La tolerancia a estrés osmótico ocurre por medio de una red multigénica compleja que involucra diferentes mecanismos bioquímicos, fisiológicos y moleculares (Chen y Jiang, 2010). Una de las estrategias utilizadas por la planta para mitigar el estrés osmótico es la acumulación de compuestos osmoprotectores llamados osmolitos (Ahmad y Prasad, 2012). Estos son conocidos como metabolitos compatibles ya que no interfieren aparentemente con el

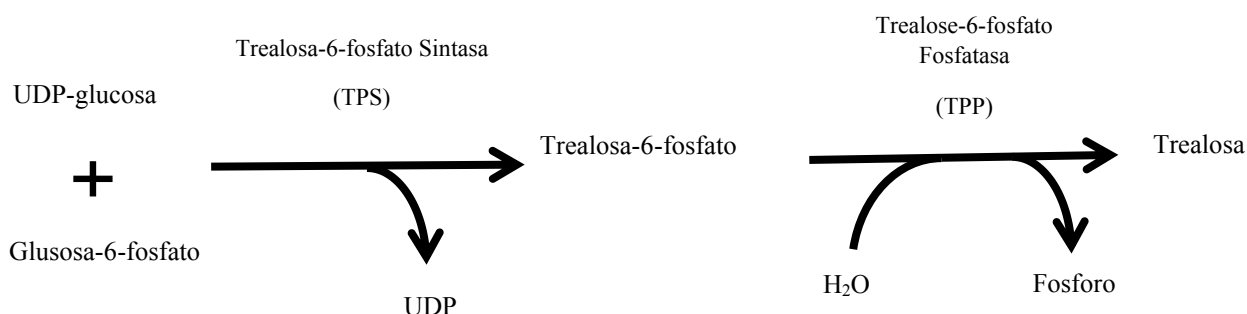
metabolismo normal de la célula (Ahmad *et al.*, 2013; Ahmad y Prasad, 2012). La función primaria de los solutos compatibles es mantener la turgencia celular y proporcionar así el gradiente de conducción para la absorción de agua.

Diferentes estudios indican que estos osmolitos también pueden actuar como secuestradores de radicales libres o como chaperonas que estabilizan directamente membranas y/o proteínas (Diamant *et al.*, 2003; McNeil *et al.*, 2000). El glicerol y la sacarosa fueron descubiertos por métodos empíricos, ayudan a proteger las macromoléculas biológicas contra los efectos dañinos de la salinidad. Posteriormente, un examen sistemático de los diferentes compuestos condujo a la identificación de una gran variedad de moléculas también capaces de proporcionar protección como es la trealosa (Arakawa y Timasheff, 1985).

La trealosa, un disacárido no reductor, es uno de los osmoprotectores más estudiados para el ajuste osmótico en plantas bajo estrés. Las propiedades físico-químicas, como la ausencia de extremos reductores que intervienen en la formación del enlace glucosídico, hacen que este disacárido sea resistente al calor, al pH y a la reacción de Maillard, además de ser capaz de formar una estructura similar al vidrio que puede estabilizar las enzimas, las proteínas y las membranas lipídicas; lo que confiere a la trealosa no sólo ser una fuente de energía sino también la capacidad de proteger las estructuras biológicas de los daños durante el estrés abiótico (Abdelgawad *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2013; Mostofa *et al.*, 2015). Otro de los atributos reportado por Bae *et al.*, 2005 es que la trealosa puede actuar como elicitador de los genes que intervienen en la molécula de desintoxicación y estrés, debido a su propiedad de alterar los niveles de los factores de transcripción, la modificación de la pared celular, el metabolismo del

nitrógeno y los genes de la biosíntesis de los ácidos grasos cuando se aplica de manera exógena.

Se han reportado al menos cinco vías biosintéticas de trealosa en diferentes organismos (Avonce *et al.*, 2006). La vía mejor caracterizada y ampliamente distribuida en la síntesis de trealosa es la que involucra dos enzimas: trealosa-6-fosfato sintasa (*TPS*) y trealosa-6-fosfato fosfatasa (*TPP*). En el primer paso, *TPS* transfiere la glucosa de UDP-glucosa (UDPG) a la glucosa-6-fosfato (G6P) para producir trealosa-6-fosfato (T6P), que es desfosforilada por *TPP* para producir trealosa libre en el segundo paso (Avonce *et al.*, 2006; Svanström *et al.*, 2014)(Figura 1).



Esquema 1. Ruta de síntesis de la trealosa en plantas.

Por su parte, el maíz es uno de los principales cultivos en todo el mundo, esto por su importancia tanto como alimento de consumo humano como animal, así como, por sus usos industriales (Martínez-Cruz, 2014). Este cultivo es altamente sensible al estrés abiótico causado por la sequía, la salinidad excesiva y la temperatura extrema, reduciendo el rendimiento hasta en un 15%, haciendo necesario implementar diferentes tácticas para minimizar las pérdidas causadas

por estrés en este cultivo. Debido a lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar los cambios fenotípicos, bioquímicos, fisiológicos y niveles de plántulas de dos líneas de maíz (*Zea mays*) con fenotipos susceptibles y resistentes CML 311 y CML 551 respectivamente; bajo tres niveles de salinidad (0, 30 y 60 mM de NaCl) y analizar la expresión diferencial de los genes *TPS/TPP* precursores de trealosa bajo estas condiciones de estrés.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamiento de estrés

Se utilizaron dos líneas de semillas de maíz (*Zea mays*), la CML 311 y CML 551 categorizadas como susceptibles (S) y resistentes (R) a sequía, alta temperatura y bajo nivel de nitrógeno por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, México) quien suministraron el material. Las semillas se germinaron en invernadero utilizando macetas de plástico (15" x 15"), el sustrato estuvo compuesto por perlita, pumicita y peatmoss en una relación 1: 1: 3. Las plantas se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: 12 h de fotoperíodo, 61 % de humedad relativa y 30 ° C.

3.3.2 Tratamientos de salinidad

Los siguientes tratamientos de estrés osmótico inducido por la adición de NaCl₂ al agua de riego se aplicó a las plantas de maíz en etapa V3 por siete días: (3.7) tratamiento de estrés por sales a una concentración de 30 mM de NaCl₂ con una conductancia de 3.7 mS, (6.7) tratamiento de estrés por sales a una concentración de 60 mM de NaCl₂ con una conductancia de 6.7 mS y (C) tratamiento control con un riego sin sal añadida con una conductancia de 0.7 mS. Para el análisis de expresión génica se tomaron muestras de una mezcla de doce hojas a las 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 60 h desde el inicio del experimento de estrés osmótico (R3.7, R6.7, S3.7 y S6.7), al igual que sus

controles (RC y SC). Para los análisis fenotípicos y fisiológicos se tomaron muestras de raíz y hojas a las 72 h del inicio del experimento. Todas las muestras se congelaron en hielo seco y fueron almacenadas a - 70 ° C.

3.3.3 Evaluación fenotípica y fisiológica de plántulas de maíz bajo estrés osmótico

Después del tratamiento de salinidad, se evaluó las características agronómicas la cual consistió en la medición de altura de planta y el conteo de número de hoja. De igual manera se realizaron pruebas fisiológicas que consistieron en la cuantificación de pigmentos fotosintéticos y estabilidad de la membrana celular.

3.3.3.1 Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos: clorofilas a y b (chl a y chl b) y carotenoides totales (caro) se extrajeron de la hoja de maíz colocando 100 mg de hoja fresca en 10 mL de acetona fría al 80% (v/v) y agitación durante la noche. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 12,000 rpm, y la absorbancia se midió a 663, 646 y 470 nm. La concentración de clorofilas y carotenoides se calculó utilizando las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Wellburn, 1983:

Clorofila a (chl a; $\mu\text{g} \cdot \text{mL}$) = $12.21 \cdot A_{663} - 2.81 \cdot A_{646}$;

Clorofila b (chl b; $\mu\text{g} \cdot \text{mL}$) = $20.13 \cdot A_{646} - 5.03 \cdot A_{663}$;

Carotenoides totales ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}$) = $(1000 \cdot A_{470} - 3.27 \cdot [\text{chl a}] - 104 \cdot \text{chl b}) / 229$

Los valores calculados finalmente se convirtieron a mg/g de peso seco (DW)

3.3.3.2 Determinación de la estabilidad de membrana (CMS)

El CMS se determinó siguiendo el protocolo y formula propuesto por Jamil *et al.*, 2009, quién usó hojas completamente expandidas de cada línea, tratamiento y repetición. Veinte discos (0.5 cm de diámetro) cortadas de estas hojas se sumergieron en agua destilada contenida en tubos de ensayo. Los tubos se mantuvieron a 4 °C en incubadora durante 24 h, seguido de calentamiento a 25 °C y medición de la conductividad eléctrica (C1) de los contenidos. Las muestras de hojas se colocaron en autoclave durante 15 min a 120 °C y se midió nuevamente la conductividad eléctrica de los contenidos (C2). El daño celular se determinó usando la fórmula: $(C1 / C2) * 100$.

3.3.3.3 Evaluación de parámetros bioquímicos

3.3.3.3.1 Material vegetal y preparación de extractos

El tejido de la hoja (0.1 - 0.3 g) se maceró con hielo seco y el contenido se colocó en un tubo de ensayo, se agregaron 4 mL de agua destilada y luego se hirvió en un baño de agua durante 30 min a 100 °C. Alícuotas del sobrenadante se usaron para determinar el contenido total de azúcar y prolina.

3.3.3.3.2 Determinación del contenido total de azúcares

El contenido total de azúcar se determinó de acuerdo con Dubois *et al.*, (1951). Se tomaron 2 mL de extracto de muestra y se añadieron 50 µl de fenol al 80%. Luego se añadieron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. El tubo se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente y luego se colocó durante 20 min en baño maría a 30 °C. La absorbancia se midió a 490 nm para hexosas y 480 nm para pentosas. El contenido total de azúcar se calculó utilizando una curva estándar basada en glucosa y se expresó en µg/g.

3.3.3.3.3 Determinación del contenido de prolina

El análisis del contenido de prolina libre se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Bates *et al.*, 1973. Se colocó 1 mL del extracto de muestra en un tubo de ensayo y se agregaron lentamente 2 mL de mezcla de reacción: ninhidrina al 1% (p/v) en agua destilada al 40% (v/v), ácido acético al 60% (v/v). El tubo de ensayo con una esfera de vidrio se hirvió en el baño de agua durante 15 min a 100 °C. Después de enfriar en un baño de agua (20 °C) durante 10 min, se retiró la esfera de vidrio y se añadieron 5 mL de Toluol al tubo. Durante los siguientes 15 s, el tubo se agitó en vortex y se incubó durante 90 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Se produjeron dos fases; la parte superior fue recuperada y se midió su absorbancia a 520 nm. El contenido de prolina libre se calculó utilizando una curva estándar basada en L-prolina y se expresó en µmol/g de peso fresco (Carillo y Gibon, 2011).

3.3.3.4 Ensayos de actividad enzimática

El extracto para medir la actividad de las especies reactivas de oxígeno se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Elavarthi y Martin, (2010). El tejido de la hoja (0,3 g) se maceró con hielo seco y se resuspendió en 1 mL de solución de homogeneización para SOD (KPO_4 50 mM a pH 7), EDTA 0,1 mM y polivinilpirrolidona al 1% (p / v), se mezcló mediante vortex durante 30 s y se centrifugó 30 s a 13, 200 rpm por 5 min. El sobrenadante se usó para determinar la actividad de superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT).

3.3.3.4.1 Actividad de Superóxido de Dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se midió espectrofotométricamente como describen Magnani *et al.*, (2000) y Marklund y Marklund, (1974) usando pirogalol como sustrato. La mezcla de reacción consistió en 50 μL de extracto de proteína, 1000 μL de tampón tris-EDTA- Na_2 (pH 8.2, 23 mmol·L⁻¹, 3.3 mmol·L⁻¹) y 1000 μL de pirogalol (0.2 mmol·L⁻¹) y leídas a 480 nm. La actividad de SOD fue expresado en U/mg de proteína, donde 1U de SOD es la cantidad requerida para inhibir la autooxidación de pirogalol en un 50%.

3.3.3.4.2 Actividad de Peroxidasa (POD)

La actividad de POD se determinó de acuerdo con García-López *et al.*, (2018) utilizando pirogalol como sustrato. El volumen final de la reacción fue de 3 mL que contenía 15 μ L de extracto de proteína, 2.5 mL de tampón fosfato (pH 6, 100 mmol·L), 320 μ L de pirogalol al 5% y reaccionó con 165 μ L de H₂O₂ a 0.147 mmol·L. La reacción inicio con la adición de H₂O₂, y la absorbancia se midió a 420 nm cada 30 s durante 1 min. 1 unidad de POD se define como la cantidad requerida para inhibir la autooxidación de pirogalol en un 50%.

3.3.3.4.3 Actividad de Ascorbato Peroxidasa (APX)

La actividad APX se determinó según lo descrito por García-López *et al.*, (2018); después de la disminución de la absorbancia a 290 nm debido a la oxidación del ascorbato. La mezcla de reacción consistió en 15 μ L de extracto de proteína, 885 μ L de tampón fosfato (pH 6, 50 mmol·L⁻¹), 50 μ L de ácido ascórbico 10 mmol·L⁻¹ y reaccionó con 50 μ L de H₂O₂ a 10 mmol·L⁻¹. La actividad APX se expresó como la cantidad de proteína que produce 1 mmol de ascorbato oxidado por min.

3.3.3.4.4 Actividad de Catalasa (CAT)

La descomposición de H₂O₂ se midió por la disminución de la absorbancia a 240 nm según García-López *et al.*, (2018). La mezcla de reacción

consistió en 15 μL del extracto de proteína, 965 μL de tampón fosfato (pH 6, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) y reaccionó con 20 μL de 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 en un volumen de reacción de 1 mL. La actividad específica de todas las enzimas se expresó como unidades de proteína mg^{-1} . La concentración de proteína se determinó según Bradford (1976) utilizando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como estándar.

3.3.3.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

ARN total se extrajo de plántulas de *Z. mays* bajo estrés salino, así como sus controles, utilizando el protocolo propuesto por Stiekema *et al.*, (1988). La biblioteca de ADNc se construyó mediante transcripción reversa (RT) utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando oligos degenerados. El ADNc se usó como plantilla en la amplificación por PCR y qPCR.

3.3.3.6 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

El qPCR se realizó en el termociclador LightCycler 480 utilizando el kit PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix de Applied Biosystem, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la expresión de los genes, un par de cebadores para *TPS-3* (F- AAGTCAAACCACAGGGAGTAAG / R- TGTCTCATCGGACCTATCAT) y *TPP-1* (F- TGGAGATGACAGAACAGATGAAG / R- GCGTCACTCTCTTTTGGGTATAG) y el gen de 18S ribosómico (F-CTGAGAAACGGCTACCACA / R-

CCCAAGGTCCAACTACGAG) se utilizó como gen endógeno. El protocolo de temperatura fue un ciclo de 120 s a 50°C, seguido de otro ciclo de 120 s a 95°C, 45 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a 60°C y 60 s a 72°C, la fluorescencia se detectó a 72°C. El cambio en la expresión relativa se calculó utilizando el método $2^{\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct \text{ control} = (Ct \text{ gen objetivo} - Ct \text{ gen de referencia})$, para después ser normalizado utilizando el gen control endógeno $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ tratado} - \Delta Ct \text{ no tratado})$ y finalmente la expresión diferencial de los genes *TPS* y *TPP* fue calculados y representados mediante Log 2.

3.3.3.7 Análisis estadístico

Los tres tratamientos se realizaron en un diseño factorial completamente al azar 2 x 3 con 16 repeticiones. Los resultados se reportaron como media \pm desviación estándar. La diferencia estadísticamente significativa entre las muestras se analizó mediante ANOVA de una vía, en caso de haber diferencia significativa las medias se compararon por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA) y el paquete estadístico SPSS versión 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.4 Resultados

3.4.1 Análisis de altura plántulas y numero de hojas bajo estrés osmótico.

En las plántulas de maíz bajo estrés osmóticos se observó que, en las plántulas resistentes, el grupo control (RC) obtuvo una altura promedio de 12.713 ± 1.907 cm, mientras que las plántulas regadas con una solución de 3.7 mS (R3.7) presentaron una altura 13.213 ± 1.248 cm y la línea sometida a una concentración de sales de 6.7 mS (R6.7) presentó una altura de 11.494 ± 1.933 cm. Por su parte, la línea susceptible, las plántulas control (SC) presentaron una altura promedio de 11.164 ± 1.339 , en el caso de las S3.7 fue de 11.173 ± 1.256 cm de altura y en el tratamiento S6.7 se observó una altura de 11.319 ± 1.602 cm. El análisis estadístico mostro una diferencia significativa ($p < 0.005$) entre las dos líneas, de las cuales la línea resistente mostro mayor altura que las líneas susceptibles (Figura 1a).

En el número de hojas se observó que en el tratamiento RC y R3.7 presentaron un promedio de 3.313 ± 0.464 hojas y el tratamiento R6.7 se observó 3 ± 0.01 hojas en promedio por plántula. En el caso de la línea susceptible, el tratamiento control (SC) presentó un promedio de 3.071 ± 0.267 hojas, las plántulas del grupo S3.7 fue de 3.437 ± 0.512 hojas y para las S6.7 se observó un promedio de 3.062 ± 0.442 hojas. Los análisis estadísticos mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.009$);

reportando que en el tratamiento que presento un mayor número de hojas fue el tratamiento 3.7 mS. (Figura 1b). Ver anexo 1

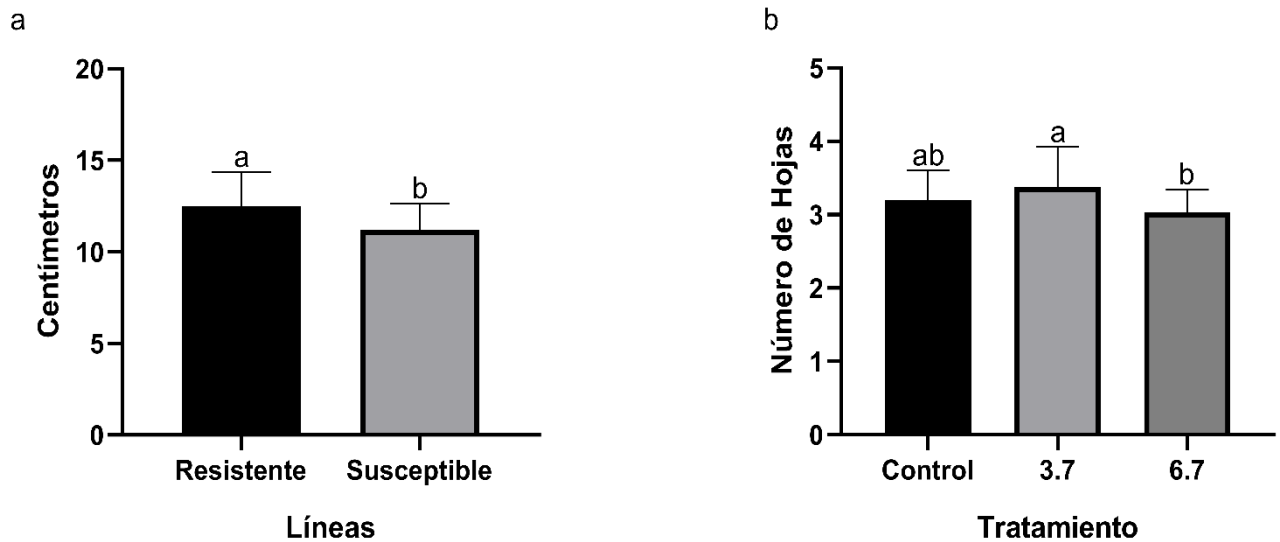


Figura 1. Evaluación agronómica de plántulas de maíz sometidos a estrés salino. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey: (a) Altura de planta; (b) Numero de hojas.

3.4.2 Pigmentos fotosintéticos

El análisis de pigmentos fotosintéticos en plantas resistentes mostró que las plantas control (RC) presentó una concentración de la clorofila tipo a (chl a) de 1.394 ± 0.206 mg/g de peso seco (PS); en el caso de las líneas R3.7 se observó una disminución a 1.275 ± 0.175 mg/g PS respecto al control. Las plántulas R6.7 presentó un aumento a 1.670 ± 0.388 mg/g PS. En las líneas susceptibles control (SC) mostró una concentración de chl a de 1.750 ± 0.345 mg/g PD; en el caso de las S3.7 se observó un incremento a 1.861 ± 0.198 mg/g

PS respecto al control y para las S6.7 se observó un decremento a 1.698 ± 0.297 mg/g PS.

Respecto a la concentración de la clorofila tipo *b* (*chl b*) las líneas resistentes mostraron que las RC obtuvieron una concentración de 0.399 ± 0.065 mg/g PS, mientras que las R3.7 mostraron una disminución a 0.372 ± 0.062 mg/g PS. Las plántulas del grupo R6.7 mostraron un incremento en su concentración a 0.478 ± 0.214 mg/g PS comparado al control. Por otro lado, la línea susceptible del grupo SC mostraron una concentración de *chl b* de 0.509 ± 0.094 mg/g PS, mientras que las S3.7 presentaron un aumento a 0.529 ± 0.078 mg/g PS y un decremento en las S6.7 a 0.497 ± 0.100 mg/g PS.

En el caso de la concentración de carotenoides totales (*caro*) se observó que las RC mostraron una acumulación de 0.226 ± 0.062 mg/g PS; mientras, las R3.7 presentaron una disminución a 0.173 ± 0.031 mg/g PS y en el caso de las R6.7 se observó un aumento a 0.302 ± 0.040 mg/g PS. Por otro lado, las líneas susceptibles control (SC) mostraron una concentración de *caro* de 0.269 ± 0.099 mg/g PS; en el caso de las S3.7 se observó un incremento a 0.313 ± 0.030 mg/g PS respecto al control y en el caso S6.7 se observó un decremento a 0.231 ± 0.067 mg/g PS.

Los análisis estadísticos demostraron que en el caso de la clorofila tipo *a* y los carotenoides existe interacción entre los componentes principales ($p \leq 0.05$) demostrando que existe un comportamiento diferente entre las líneas y los

diferentes tratamientos. En el caso de la clorofila tipo *b* existe diferencia significativa entre los tratamientos, mostrando el efecto de los tratamientos en la producción de chl *b*. En la Figura 2 se observa que las líneas susceptibles son las que presenta la mayor concentración de chl *a*, chl *b* y carotenoides independientemente el tratamiento aplicado.

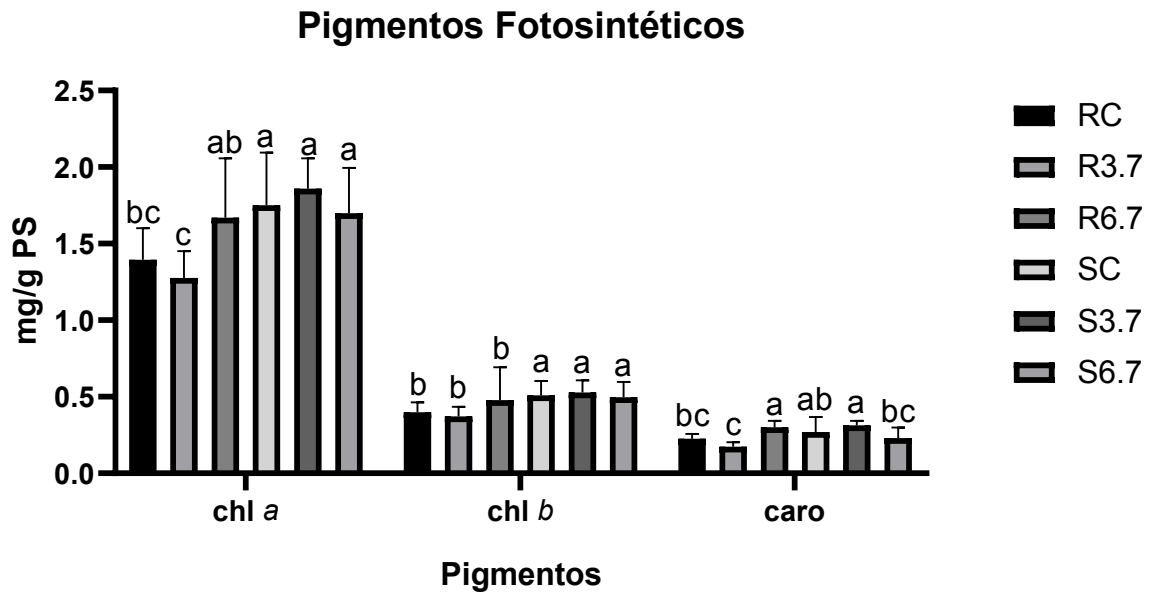


Figura 2. Concentración de los diferentes pigmentos fotosintéticos: clorofila tipo *a* (chl *a*), clorofila tipo *b* (chl *b*) y carotenoides (caro) en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

3.4.3 Estabilidad de la membrana (CMS)

Con respecto a la estabilidad de la membrana presentadas por las plántulas baja estrés osmótico, se observó que para el caso del grupo RC fue

de $21.53 \pm 5.949\%$. Para las plántulas R3.7 hubo una disminución a $20.52 \pm 6.52\%$, mientras que para las del R6.7 se presentó un aumento a $24.22 \pm 11.063\%$. Por otro lado, las plántulas SC mostraron un daño a la pared de $18.12 \pm 3.57\%$, mientras que el caso de las S3.7 se observó un aumento en el porcentaje de daño a $21.93 \pm 11.48\%$ (Figura 3). Los resultados estadísticos mostraron que no existe diferencia significativa entre las variables. Ver anexo 2

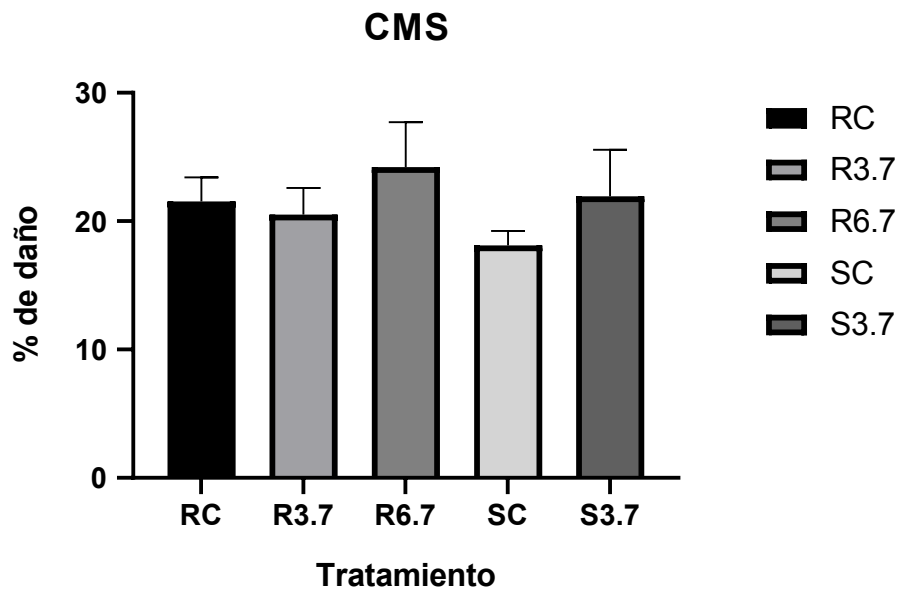


Figura 3. Porcentaje de daño presentado por las plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE.

3.4.4 Azúcares totales

Referente a concentración de pentosas las plántulas del grupo RC obtuvieron $116.486 \pm 30.642 \mu\text{g/g PS}$, en el tratamiento R3.7 se observó una disminución de la concentración a $114.266 \pm 25.333 \mu\text{g/g PS}$ y para el

experimento R6.7 presentó una disminución de la concentración a 113.668 ± 24.971 $\mu\text{g/g}$ PS. Por su parte en la cuantificación de hexosas el tratamiento RC fue de 99.702 ± 22.584 $\mu\text{g/g}$ PS, mientras que las plántulas R3.7 aumento a 112.474 ± 23.458 $\mu\text{g/g}$ PS comparado con el control; mismo caso observado en el tratamiento R6.7 con una concentración de 107.779 ± 23.382 $\mu\text{g/g}$ PS.

Por otro lado, en el caso de las plántulas susceptibles se observó que en la acumulación de pentosas el grupo SC fue de 25.259 ± 7.286 $\mu\text{g/g}$ PS. En las plántulas S3.7 se observó un aumento a 37.278 ± 7.024 $\mu\text{g/g}$ PS y una disminución en el caso de las S6.7 a 25.154 ± 5.080 $\mu\text{g/g}$ PS. De igual forma en lo concerniente a la acumulación de hexosas, en el grupo SC se reporta una concentración de 22.995 ± 6.545 $\mu\text{g/g}$ PS, en el caso del tratamiento S3.7 se observó un aumento a 34.152 ± 4.334 $\mu\text{g/g}$ PS y en las plántulas S6.7 fue de 26.447 ± 4.288 $\mu\text{g/g}$ PS. Respecto a los análisis estadísticos, estos reportan que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las líneas siendo, la línea resistente la que presentó mayor acumulación de azúcares totales (Figura 4).

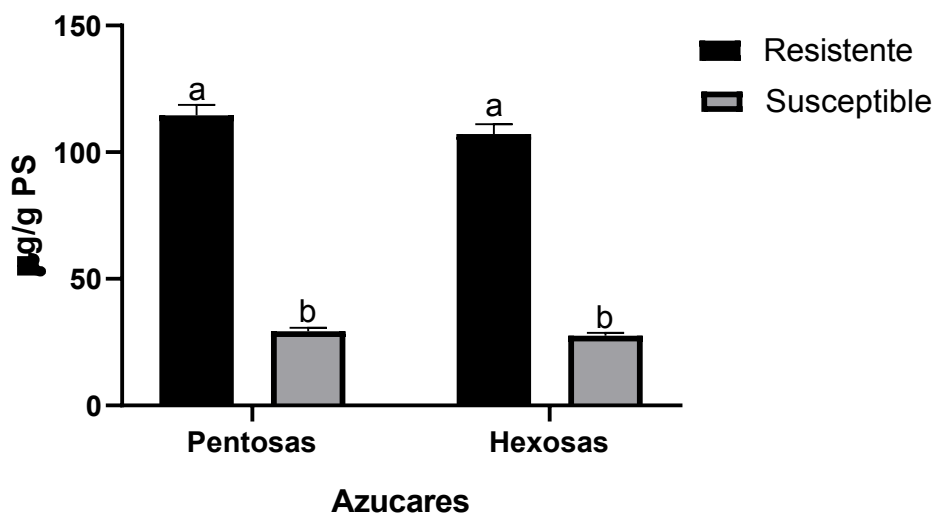


Figura 4. Concentración de los diferentes azúcares, pentosa y hexosas, en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

3.4.5 Prolina

La cuantificación de prolina libre al final del ensayo mostró que las plántulas resistentes control (RC) obtuvieron una concentración de 30.694 ± 3.525 $\mu\text{mol/mg}$ de peso fresco (PF). En el caso de las R3.7 se observó una disminución a 2.244 ± 0.810 $\mu\text{mol/mg}$ PF y las R6.7 se observó un decremento a 12.777 ± 1.181 $\mu\text{mol/mg}$ PF con respecto a las plántulas control.

Respecto a las plántulas susceptibles mostraron que el grupo SC presento una concentración final de $18.277 \pm 0.894 \mu\text{mol/g PF}$. Las plántulas bajo el nivel S3.7 presentaron un incremento a $63.111 \pm 1.257 \mu\text{mol/g PF}$ y en las plántulas S6.7 fue de $5.527 \pm 1.113 \mu\text{mol/g PF}$. El análisis estadístico indicó que existe interacción entre los factores principales ($p = 0.001$) demostrando que existe un comportamiento diferente entre las líneas a diferentes niveles de estrés en lo que a la producción de prolina se refiere (Figura 5). Ver anexo 3

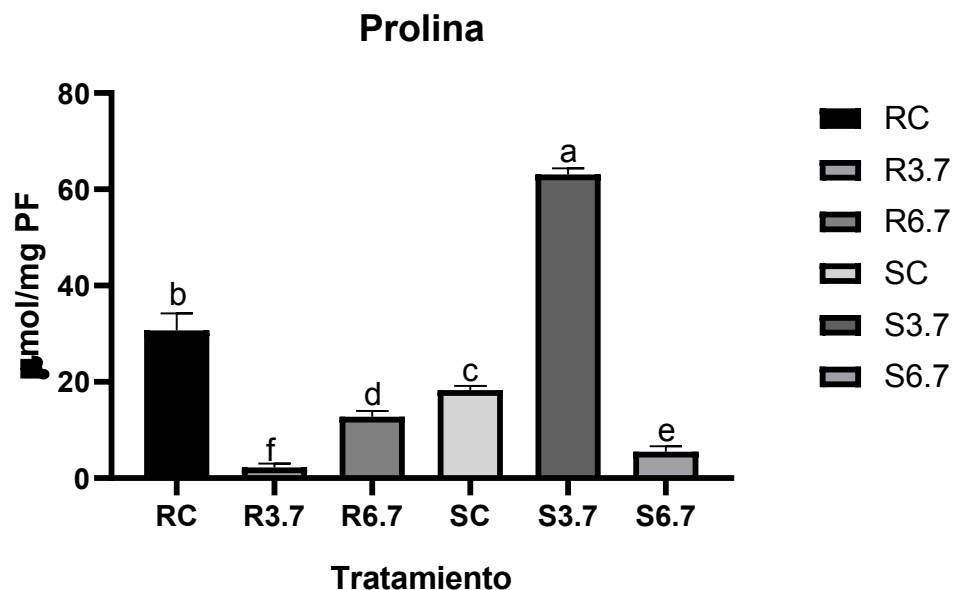


Figura 5. Concentración de prolina libre en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

3.4.6 Actividad Superóxido de Dismutasas (SOD)

La actividad de Superóxido de Dismutasa (SOD) fue de 0.045 ± 0.012 U/mg de proteína para las del grupo RC, 0.17 ± 0.008 U/mg para las del tipo R3.7 y para las R6.7 fue de 0.007 ± 0.001 U/mg. Por su parte, en el caso de las SC se observó una concentración de 0.063 ± 0.001 U/mg, mientras que para las del grupo S3.7 fue de 0.045 ± 0.006 U/mg y para las S6.7 fue de 0.040 ± 0.002 U/mg (Figura 6). En lo concerniente a los análisis estadísticos, estos mostraron que, aunque no existe relación entre los factores principales, sin embargo, se observó diferencia significativa entre líneas y niveles de estrés ($p = 0.000$).

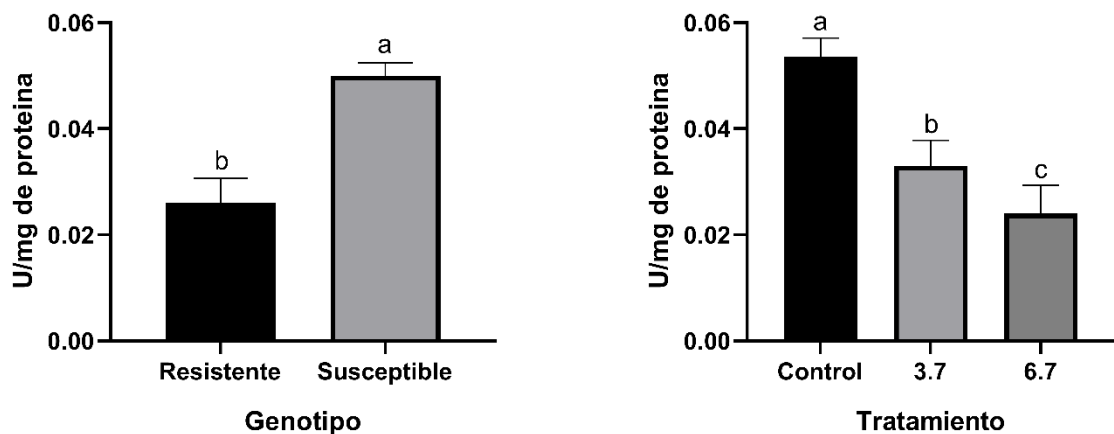


Figura 6. Actividad de SOD en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre líneas y tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

3.4.7 Actividad de Peroxidasa (POD)

La actividad de la enzima Peroxidasa (POD) en plántulas de maíz bajo estrés osmótico mostró que en las RC presento una actividad de 0.138 ± 0.034 U/mg de proteína, mientras que en la R3.7 fue de 0.069 ± 0.033 U/mg y en las del grupo R6.7 fue de 0.088 ± 0.047 U/mg de proteína. Las plántulas del grupo SC fue de 0.120 ± 0.009 U/mg, las plántulas S3.7 mostró una concentración de 0.122 ± 0.008 U/mg y en el caso de las del grupo S6.7 fue de 0.106 ± 0.020 U/mg. Análisis estadísticos mostraron que existe interacción entre los factores principales ($p = 0.001$) demostrando que la actividad de POD se comporta de manera distinta entre las líneas expuesta a diferentes niveles de estrés osmótico (Figura 7).

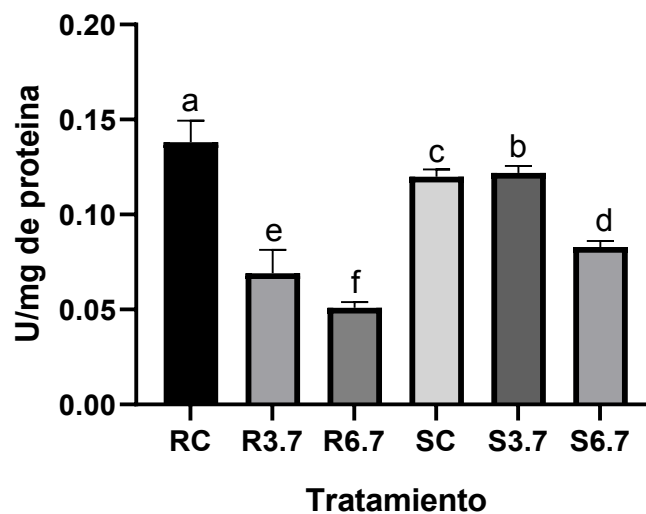


Figura 7. Actividad de POD en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre los efectos principales: líneas y tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

3.4.8 Actividad de (Ascorbato Peroxidasa) APX

En el caso de la actividad de ascorbato peroxidasa (APX) en las plántulas de maíz enfrentadas a estrés por salinidad del grupo RC se observó una concentración promedio de 14.678 ± 3.051 U/mg proteína; en el tratamiento R3.7 fue de 16.298 ± 3.014 U/mg y en las del grupo R6.7 fue de 13.470 ± 3.084 de U/mg. En el caso en las plantas SC se reportó una concentración de 11.838 ± 1.771 U/mg de proteína. Las plántulas del grupo S3.7 fue de 12.935 ± 2.083 U/mg y para las S6.7 fue de 11.548 ± 1.813 U/mg. Los análisis estadísticos demostraron que existe diferencia significativa ($p = 0.001$) entre los tratamientos (Figura 8).

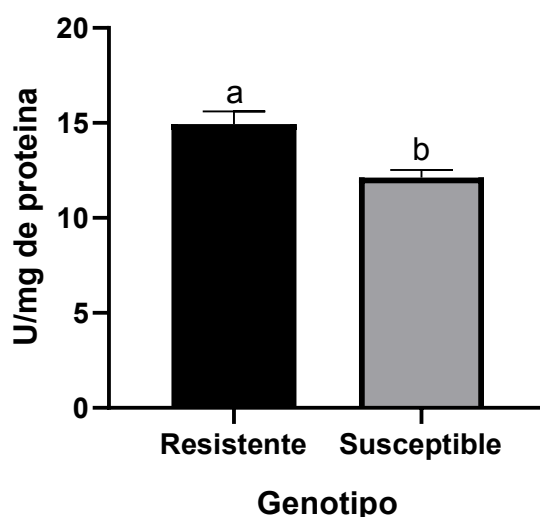


Figura 8. Actividad de APX en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre líneas ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

3.4.9 Actividad de Catalasa (CAT)

La prueba enzimática para determinación de la actividad de catalasas, mostró que en las plántulas RC presentaron una concentración de 4.826 ± 1.476 U/mg de proteína; en el caso de las R3.7 fue de 11.544 ± 1.133 U/mg y 6.637 ± 2.318 U/mg para las plántulas R6.7. La línea susceptible mostró que para el grupo SC se obtuvo una concentración de 5.1181 ± 1.726 U/mg. Las plántulas S3.7 fue de 6.942 ± 1.726 U/mg y para las del grupo S6.7 se observó una concentración de 4.706 ± 0.929 U/mg. Estadísticamente se mostró que existe relación entre los factores principales ($p = 0.014$) demostrando que la actividad de CAT se comportó de manera distinta entre tratamientos y líneas (Figura 9).

Ver anexo 4

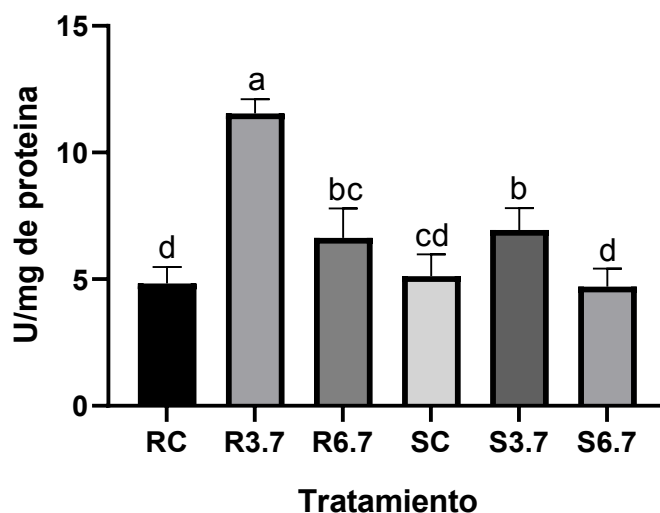
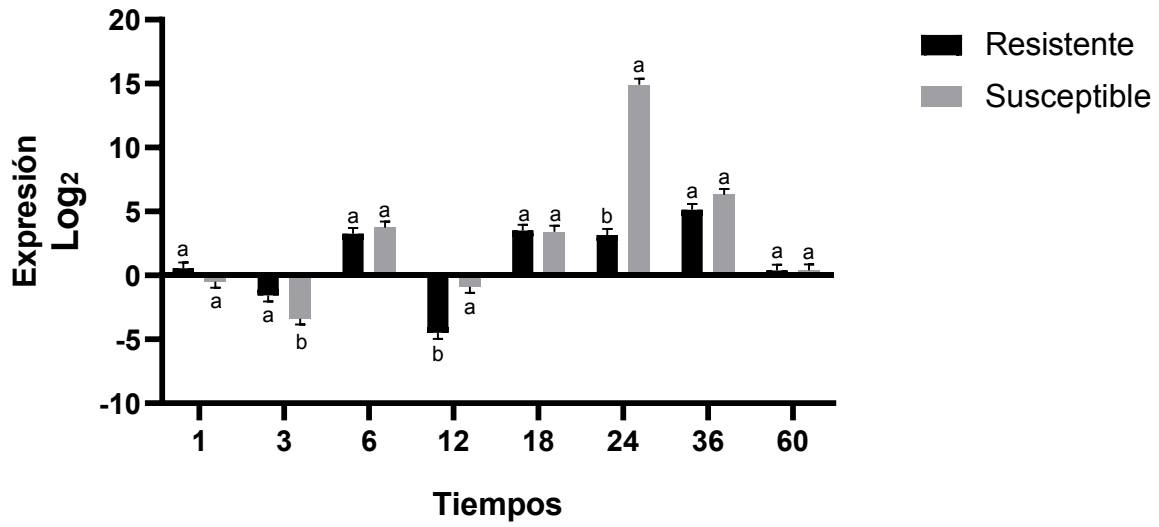


Figura 9. Actividad de CAT en plántulas de maíz bajo estrés osmótico. Los valores son las medias \pm DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas dada la interacción de los componentes principales: líneas y tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

3.4.10 Expresión relativa de los genes *TPS* y *TPP* bajo estrés osmótico.

El cambio en la expresión de los genes *TPS-3* y *TPP-1* se examinó en hojas de plántulas de maíz sometidas a diferentes niveles de estrés osmótico. En el caso del gen *TPS-3* en plántulas resistentes, se observó que para el tratamiento R3.7, presentó un incremento en la primera hora iniciado el estrés para después decrecer a niveles normales hasta las 12 h. Después de este lapso se observó un incremento en la expresión a las 18 h seguido de un decremento de esta hasta el final del experimento. Por otra parte, las plántulas susceptibles bajo esta misma condición (S3.7) se observaron que esta se mantiene regulada negativamente en comparación al gen endógeno en las primeras 6 h, aumentando su expresión a las 12 h hasta 72 h (Figura 10a). Referente al patrón de expresión de la *TPS-3* bajo condiciones de salinidad a 6.7 mS, se observó que en el caso de las resistentes R6.7 hubo un aumento en la expresión, que después se vio disminuido a las tres horas subsiguientes iniciado el estrés. Este mismo patrón se observó en las 6 h y 12 h, para después observarse un aumento en la expresión de la *TPS* a partir de las 18 h hasta el final del experimento. El comportamiento de las plántulas susceptibles bajo estas condiciones (S6.7) mostró un aumento en la expresión a partir de las seis horas seguido de un periodo de subexpresión a las 12 h, para a partir de las 18 h hasta las 72 h observarse un aumento de la sobreexpresión de la *TPS* en comparación al endógeno (Figura 10b).

b



a

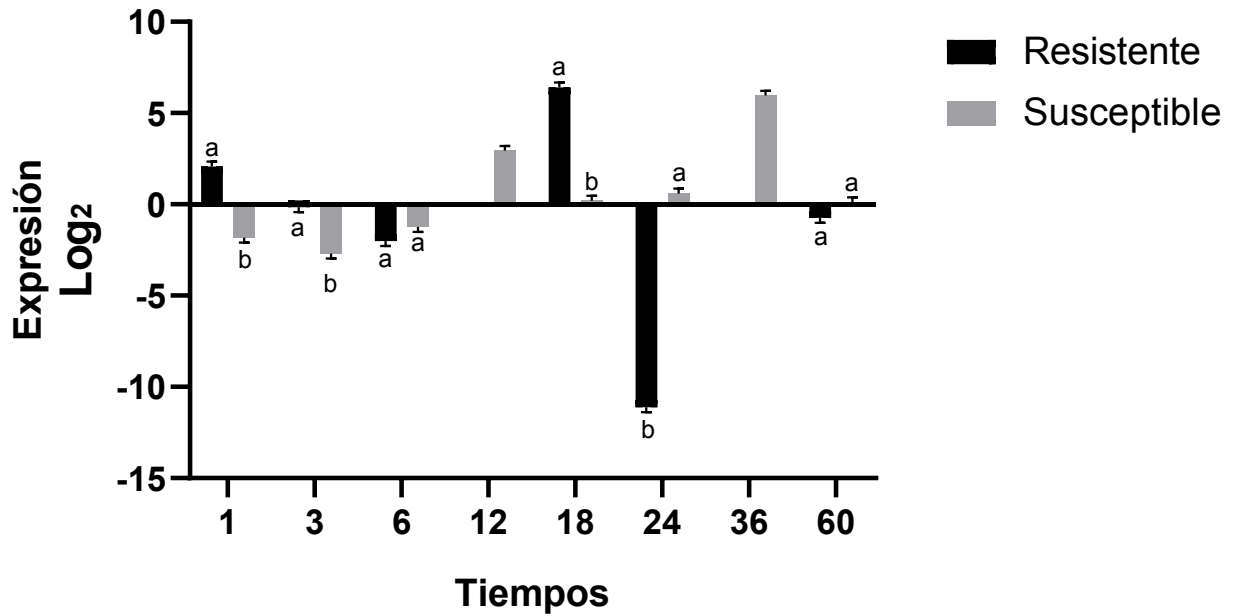
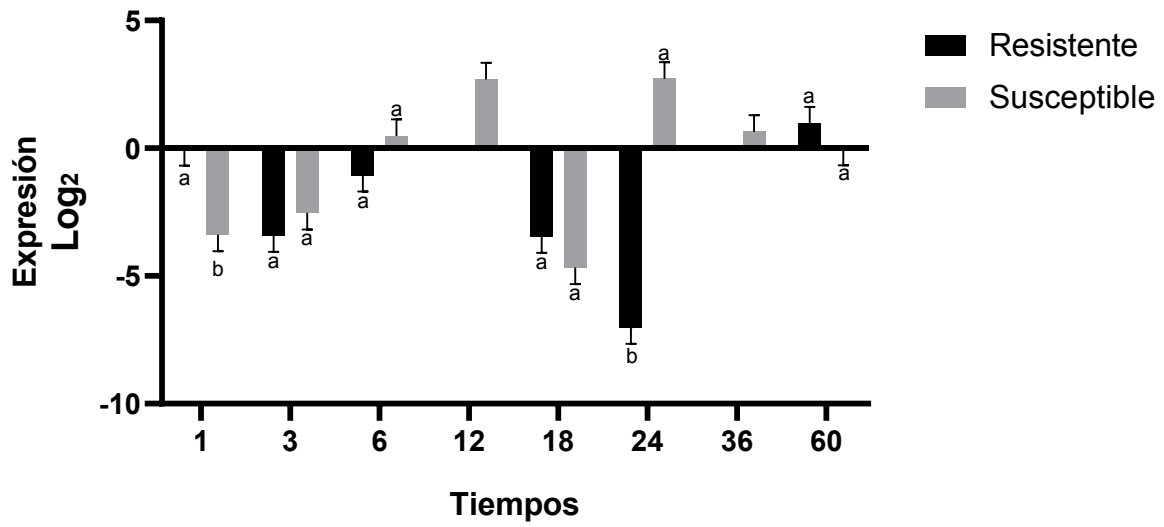


Figura 10. Resultados cuantitativos en tiempo real del cambio en la expresión del gen *TPS-3* en plántulas de maíz (*Zea mays*) resistentes y susceptibles sometidas a estrés salino. Los datos de expresión fueron reportados como $\text{Log}_2 (-\Delta\Delta\text{Ct})$, el aumento en la concentración toma un valor positivo mientras que una disminución es negativa, esto

con referencia a los valores expresados bajo condiciones de riego. Los valores son medios \pm SD. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las líneas en el mismo período de tiempo ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey: a) Expresión relativa del gen *TPS-3* en las hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles en los diferentes tiempos de toma de muestra bajo la salinidad 3.7; b) Expresión relativa del gen *TPS-3* en las hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles en los diferentes tiempos de toma de muestra bajo la salinidad 6.7.

Concerniente a la expresión del gen *TPP-1* bajo condiciones de salinidad se observó que las plántulas resistentes (R3.7) mostraron una subexpresión desde el inicio del experimento hasta las 36 h para después observándose un aumento de esta a las 72 h. De igual forma, en la línea susceptible (S3.7) se observó un aumento de la expresión después de las seis horas hasta las 12 h para después disminuir su expresión a niveles normales a las 18 h; pasado este tiempo se observó un aumento en la expresión de la *TPP* hasta el final del experimento (Figura 11a). Por su parte, los resultados obtenidos al someter las plántulas de maíz a estrés las plántulas R6.7 se mantuvo subexpresado durante todo el experimento, esto en comparación al endógeno. En el caso de la línea susceptible S6.7 se observó un aumento en la expresión en la primera hora, seguido de una reducción en expresión a niveles normales en las tres horas. Para la hora seis hubo un aumento y una disminución de esta se observó entre las 12 h hasta las 18 h para después de las 24 h observarse una sobreexpresión del gen, esto en comparación al endógeno. Al termino de las 36 h se observó una disminución de la expresión seguido de una sobreexpresión del gen al final del experimento (Figura 11b).

a



b

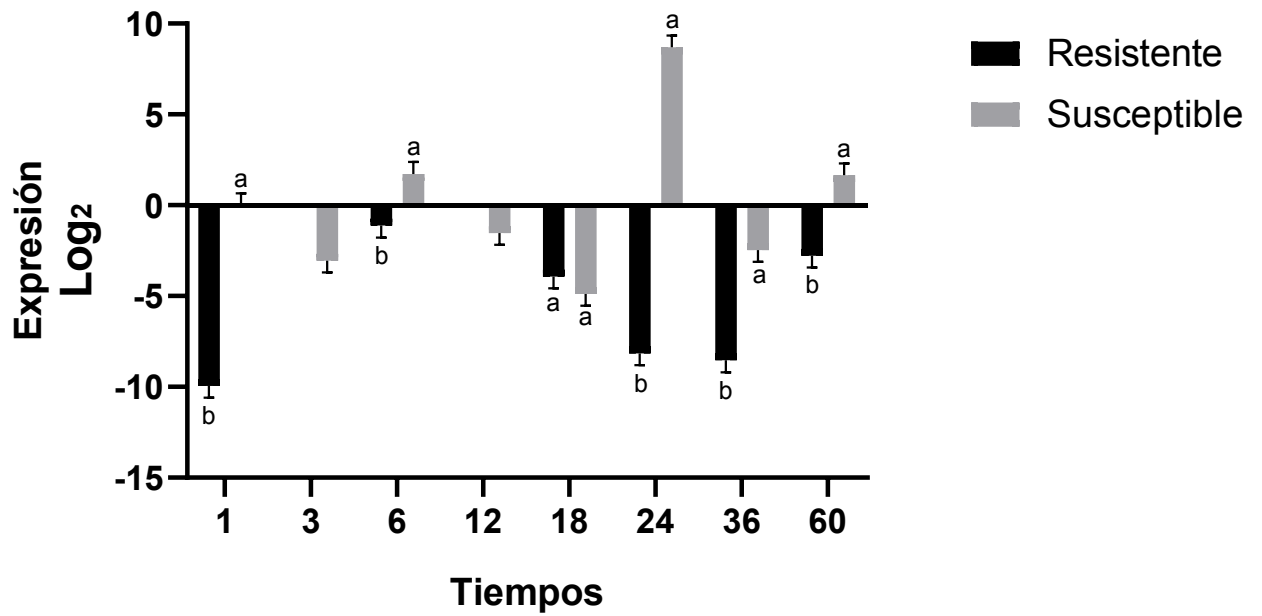


Figura 11. Resultados cuantitativos en tiempo real del cambio en la expresión del gen *TPP-1* en plántulas de maíz (*Zea mays*) resistentes y susceptibles sometidas a estrés

salino. Los datos de expresión fueron reportados como $\text{Log}_2 (-\Delta\Delta\text{Ct})$, el aumento en la concentración toma un valor positivo mientras que una disminución es negativa, esto con referencia a los valores expresados bajo condiciones de riego. Los valores son medios \pm SD. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las líneas en el mismo período de tiempo ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey: a) Expresión relativa del gen *TPP-1* en las hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles en los diferentes tiempos de toma de muestra bajo la salinidad 3.7; b) Expresión relativa del gen *TPP-1* en las hojas de las plántulas de maíz resistentes y susceptibles en los diferentes tiempos de toma de muestra bajo la salinidad 6.7.

Los análisis estadísticos mostraron que la expresión del gen *TPS-3* existe interacción ($p < 0.05$) entre los factores principales: genotipo, nivel de estrés y tiempo, encontrando que la expresión de este gen puede estar relacionado al genotipo, el nivel de salinidad y los tiempos de muestreo. En el caso de la expresión gen *TPS-3* en una salinidad de 3.7 se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los genotipos a las 1, 3, 18 y 24 h, siendo el genotipo resistente el que mostro mayor expresión en esos tiempos. De igual manera se observó diferencia significativa en la expresión de este gen a una salinidad de 6.7 en los tiempos 3, 12, 24 h. El genotipo que presento más expresión en este tiempo fue el susceptible. Dentro de los factores evaluados se observó la que el genotipo que presentó mayor expresión fue el susceptible, mientras que el nivel de salinidad fue 6.7 y en los tiempos fue a las 36 h empezado el estrés. En el caso de la expresión del gen *TPP-1* se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) en la expresión del gen *TPP-1* las 1y 24 h, siendo el genotipo susceptible el que mostro mayor expresión en esos tiempos. De igual manera se observó diferencia significativa en la

expresión de este gen a las 1, 6, 18, 36 y 60 h en una salinidad de 6.7. La expresión más alta dentro de cada factor analizado fue en el caso del genotipo, el susceptible. Mientras que el factor salinidad fue 3.7 y lo que fue en el factor tiempo se observó una mayor expresión a las 12 h.

3.5 Discusión

El estrés osmótico producido por la presencia y acumulación de sales es una de las primeras causas de toxicidad en plantas, así las plantas responden con la producción de diversos compuestos osmoprotectores como prolina, glicina betaína o trealosa que son producidos y acumulados en las células vegetales para contrarrestar la hiperosmolaridad producido por estrés (Ali y Ashraf, 2011; Chen y Jiang, 2010). En esta investigación se observó que bajo condiciones de estrés por salinidad con 30 mM de NaCl aumento el número de hojas y altura de la planta en ambas líneas; estos resultados concuerdan con lo mencionado por Abdul, 2011 donde el uso de bajas concentraciones de NaCl tiene a aumentar la altura de la planta, debido a que la elongación del tallo cuando es tratado a baja concentraciones de sal puede inducir el ajuste osmótico en la planta lo que puede inducir al crecimiento. Caso contrario a lo observado cuando se aplica una solución a una concentración de 60 mM de NaCl donde disminuyeron ambas variables de crecimiento en los dos líneas bajo estudio, esto concuerdan con lo mencionado por diferentes autores, donde este comportamiento puede deberse a los efectos negativos en la velocidad de fotosíntesis y el cambio en la actividad catalítica de las enzimas y por ende la síntesis de proteínas; así como también a la disminución en los niveles de carbohidratos y hormonas vegetales que en conjunto puede provocar la inhibición del crecimiento (Abdallah *et al.*, 2016; Mazher *et al.*, 2007; Rohman *et al.*, 2016).

La clorofila (chl *a*, *b* y *a + b*), carotenoides, así como el contenido total de los pigmentos fotosintéticos mostraron un comportamiento variado entre líneas y tratamientos. La

reducción de la capacidad fotosintética producida por la salinidad puede ser atribuida a la oxidación de los pigmentos, lo que daña los pigmentos fotosintéticos inhabilitando así la biosíntesis de estos. Este comportamiento puede deberse a la síntesis de diversos compuestos como enzimas proteolíticas y clorofilasas en respuesta a la degradación de clorofila y/o daño al fotosistema, así como, en la membrana de los tilacoides. El contenido de clorofila se utiliza para evaluar la influencia del estrés ambiental en el crecimiento y rendimiento de las plantas; este comportamiento también ha sido reportado por (Anjum *et al.*, 2011; Din *et al.*, 2011; Mostafa *et al.*, 2015; Sadak y Ahmed, 2016). Por otro lado, algunos estudios mencionaron que los pigmentos de clorofila pueden aumentar bajo estrés y parece estar relacionado con la variación en las actividades de las enzimas involucradas en la biosíntesis de clorofila (Fahad *et al.*, 2017). Por su parte, el aumento en la concentración de carotenoides puede deberse a que esta juega un papel importante en la captación de radicales libres, por lo que el aumento de este puede mejorar la capacidad de reducir los daños causados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentado así el contenido de clorofila en la planta (Chandrasekar *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2008)

Por su parte, el mantenimiento de la integridad de las membranas, es considerado una parte importante dentro de los mecanismos de tolerancia a estrés por salinidad. En este estudio se mostró que la línea resistente fue capaz de disminuir el daño a la membrana cuando es sometida a estrés intermedio y que comparado con el tratamiento R6.7 el daño es progresivo; caso contrario a lo observado en la línea susceptible S6.7. Diferentes autores han reportado un comportamiento similar y mencionan que esto puede estar relacionado con la deficiencia de agua dada la

presión osmótica ejercida por el estrés salino, lo que resulta en un mal funcionamiento de las proteínas de la membrana y canales iónicos causando pérdida en la permeabilidad y conduciendo a la fuga de electrolitos (Jamil *et al.*, 2009; Muhammad, 2012; Nedjimi, 2014).

Los cambios en la acumulación de azúcares totales, los datos mostraron una concentración significativa en la línea resistente comparado con las plantas susceptibles. La alta acumulación de azúcares ha sido demostrado por diferentes autores en varios cultivos sometidos a estrés osmótico mencionado que el incremento en los niveles de los azúcares soluble bajo estas condiciones de estrés puede deberse a que estos compuestos ayudan a mantener la turgencia y la estabilidad de la membrana (Hosseini *et al.*, 2015; Mostafa *et al.*, 2015; Sadak y Ahmed, 2016; Tawfik *et al.*, 2016). De igual forma, Hare *et al.*, 1998 menciona que una respuesta metabólica al estrés osmótico es la síntesis de osmolitos compatibles, ya que estos osmolitos ayudan al ajuste osmótico y por ende protegen las estructuras subcelulares y reduce el daño oxidativo por la presencia de radicales libres.

La prolina es un osmolito que juega un papel importante en el ajuste y la protección de las estructuras subcelulares en plantas estresadas. En respuesta al estrés osmótico, la prolina se acumula en el citosol, donde su función principal es el ajuste osmótico citoplasmático (Anjum *et al.*, 2011). La tolerancia de la planta frente a estrés osmótico está relacionada con un aumento en concentración de prolina. Los resultados obtenidos, demuestran un comportamiento diferente tanto entre líneas como su respuesta frente a estrés. En el caso de la línea susceptible se observó un incremento

significativo en la acumulación de este aminoácido (Figura 5). Este incremento en prolina se observó en otras investigaciones en diferentes cultivares, mencionando que este osmolito compatible juega un papel importante en la tolerancia de las células a varios estreses abióticos mediante el incremento de la presión osmótica en el citoplasma e incrementado el contenido de agua relativa, misma necesaria para diferentes procesos metabólicos y de crecimiento de la planta. En el caso de las plantas resistentes estas mostraron una disminución en la concentración de prolina cuando son expuestas a estrés osmótico. Diferentes autores mencionan que este tipo de respuesta indica que la baja demanda de prolina puede deberse a que otros osmolitos como la trealosa y/o otros compuestos pueden estar presentes, ya que ambos actúan como osmoprotectores (Ali y Ashraf, 2011; Nounjan y Theerakulpisut, 2012). Así mismo, Abdallah *et al.*, 2016; Sadak, 2019 demostraron que, el efecto osmoprotector de la trealosa reduce la necesidad de la planta de sintetizar y/o aumentar los niveles acumulación de otros osmolitos como prolina cuando esta se encuentra bajo condiciones de estrés osmótico.

Referente a las pruebas enzimáticas, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y POD de dos líneas diferentes de maíz bajo estrés osmótico disminuyendo significativamente, esto en comparación al control dentro de cada línea. Mientras que la actividad de las enzimas APX y CAT se observó un aumento esto en comparación al no estresado. De manera general, el estrés por sales causa daño oxidativo debido al incremento en la producción de ROS. Es por esta razón por lo cual ROS es utilizado como biomarcador del daño oxidativo en la membrana celular a causa por la presencia de sales (Nedjimi, 2014). Una disminución en la actividad de alguna de estas enzima

está relacionado con la falta o incapacidad de desintoxicación de H_2O_2 como demuestran los siguientes estudios (Ali y Ashraf, 2011; Mishra *et al.*, 2013). Algunos autores mencionan que este comportamiento de aumento de algunas enzimas antioxidantes y disminución de otras enzimas puede estar relacionado a presencia de osmolitos compatibles como la trealosa o prolina, debido a su papel para disminuir los efectos negativos inducidos por estrés sobre la estructura de las membranas celulares y las actividades de diferentes enzimas antioxidantes, así como la reducción de la generación de radicales libres (Ali y Ashraf, 2011; Crowe *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1995).

La trealosa es un osmolito compatible que ha demostrado la capacidad de proteger al organismo de diferentes tipos de estrés abiótico, resaltando su participación como mecanismo de tolerancia en muchos organismos (Iturriaga *et al.*, 2009b; Patist y Zoerb, 2005b). La principal vía biosintética es mediante la ruta *TPS-TPP*, la cual ha sido ampliamente estudiada (Avonce *et al.*, 2006; Svanström *et al.*, 2014). En este estudio, la expresión de estos genes bajo condiciones de estrés osmótico demostró que ambos genotipos son capaces de expresar los genes *TPS-3* y *TPP-1*. El genotipo caracterizado como resistente tiende responder más rápida, en cuestión de expresión, cuando este es comparado con la línea susceptible. Que por su parte fue el que presentó mayor expresión del gen *TPP-1* en comparación al genotipo resistente. La expresión de ambos genes bajo estas condiciones pudo hablar a favor del rol que pudieran tener los diferentes mecanismos de tolerancia utilizados la planta para mitigar el daño. Macovei *et al.*, 2019 menciona alto niveles de azúcares como la sacarosa ha sido correlacionada con promover la actividad de la *TPS*, mientras que bajos niveles

de azúcares está relacionada con promover las actividades de la *TPP* y la proteína quinasa relacionada con Sn1 (SnRK1). Algo que hay que tomar en cuenta respecto a la expresión de estos genes que no solamente se puede relacionar a la síntesis de trealosa, sino que estas enzimas pueden actuar como moléculas de señalización por sí solas modulando diferentes rutas metabólicas. Un ejemplo de esto es que gen *TPS*, juega un papel importante en la síntesis de almidón a través de la actividad redox postraducciona de la pirofosforilasa ADP-glucosa y participa activamente en el crecimiento, desarrollo y floración de las plantas. El en caso del gen *TPP*, puede inhibir la actividad de la proteína SnRK1, la cual es conocida por desempeñar un papel vital en las redes de transcripción del estrés vegetal y el metabolismo energético (Paul *et al.*, 2008; Ponnu *et al.*, 2011; van Dijken *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2019).

3.6 Conclusión

Con la información obtenida se puede concluir que dos líneas diferentes de maíz pueden responder de manera diferente cuando estos son expuestos a estrés osmótico, dado a que pueden utilizar diferentes estrategias para mitigar los efectos ocasionados por este tipo de estrés. De igual forma, se pudo observar cómo los parámetros fenotípicos y bioquímicos pueden ser afectados cuando estos son comparados con las plantas control. Así como, que los patrones de expresión de los genes *TPS* y *TPP* pueden ser diferentes en ambas líneas, lo cual puede estar relacionado a la activación de diferentes mecanismos para contrarrestar los daños provocados por el estrés.

3.7 Bibliografía

- Abdallah, M. M.-S., Abdelgawad, Z. A., & El-Bassiouny, H. M. S. (2016). Alleviation of the adverse effects of salinity stress using trehalose in two rice varieties. *South African Journal of Botany*, 103, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.019>
- Abdelgawad, Z., Hathout, T., El-Khallal, S., Said, E., Al-Mokadem, A., & others. (2014). Accumulation of trehalose mediates salt adaptation in rice seedlings. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 14(12), 1450–1463.
- Abdul Qados, A. M. S. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2010.06.002>
- Ahmad, P., Azooz, M. M., & Prasad, M. N. V. (Eds.). (2013). *Salt Stress in Plants*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6108-1>
- Ahmad, P., & Prasad, M. N. V. (Eds.). (2012). *Abiotic Stress Responses in Plants*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1>
- Ali, Q., & Ashraf, M. (2011a). Induction of Drought Tolerance in Maize (*Zea mays* L.) due to Exogenous Application of Trehalose: Growth, Photosynthesis, Water Relations and Oxidative Defence Mechanism: Trehalose Role in Drought Tolerance of Maize Plant. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(4), 258–271. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00463.x>
- Ali, Q., & Ashraf, M. (2011b). Induction of Drought Tolerance in Maize (*Zea mays* L.) due to Exogenous Application of Trehalose: Growth, Photosynthesis, Water Relations and Oxidative Defence Mechanism: Trehalose Role in Drought

- Tolerance of Maize Plant. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(4), 258–271. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00463.x>
- Anjum, S. A., Xie, X., Farooq, M., Wang, L., Xue, L., Shahbaz, M., & Salhab, J. (2011). Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. *African Journal of Biotechnology*, 10(47), 9647–9656.
- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, 47(3), 411–414. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83932-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83932-1)
- Ashraf, M. (2004). Genetic Variation for Salinity Tolerance in Spring Wheat. *Hereditas*, 120(2), 99–104. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1994.00099.x>
- Avonce, Mendoza-Vargas, A., Morett, E., & Iturriaga, G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-109>
- Bae, H., Herman, E., Bailey, B., Bae, H.-J., & Sicher, R. (2005). Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiologia Plantarum*, 125(1), 114–126. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00537.x>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Carillo, P., & Gibon, Y. (2011). Protocol: Extraction and determination of proline. *PrometheusWiki*.

- Chandrasekar, V., K. Sairam, R., & Srivastava, G. (2000). Physiological and biochemical responses of hexaploid and tetraploid wheat to drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 185(4), 219–227.
- Chen, H., & Jiang, J.-G. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, 18(NA), 309–319. <https://doi.org/10.1139/A10-014>
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., & Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54, 579–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.003051>
- Diamant, S., Rosenthal, D., Azem, A., Eliahu, N., Ben-Zvi, A. P., & Goloubinoff, P. (2003). Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress: Specific effectors of chaperone-mediated disaggregation. *Molecular Microbiology*, 49(2), 401–410. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03553.x>
- Din, J., Khan, S., Ali, I., Gurmani, A., & others. (2011). Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. *J Anim Plant Sci*, 21(1), 78–82.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. *Nature*, 168(4265), 167–167. <https://doi.org/10.1038/168167a0>
- Elavarthi, S., & Martin, B. (2010). Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants. En R. Sunkar (Ed.), *Plant Stress Tolerance* (Vol. 639, pp. 273–280). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_16
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M. Z., Alharby, H., Wu, C., Wang, D., &

- Huang, J. (2017). Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1147. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01147>
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21(6), 535–553. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x>
- Hosseini, S. M., Hasanloo, T., & Mohammadi, S. (2015). Physiological characteristics, antioxidant enzyme activities, and gene expression in 2 spring canola (*Brassica napus* L.) cultivars under drought stress conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(3), 413–420.
- Israel García-López, J., Lira-Saldivar, R. H., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Niño-Medina, G., Angélica Ruiz-Torres, N., Méndez-Argüello, B., & Díaz-Barriga, E. (2018). Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(5–7), 560–572. <https://doi.org/10.1080/02772248.2018.1550781>
- Iturriaga, G., Suárez, R., & Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 3793–3810.
- Jamil, M., Ashraf, M., Rehman, S., & Rha, E. S. (2009). Cell Membrane Stability (CMS): A Simple Technique to Check Salt Stress Alleviation Through Seed Priming with GA3 in Canola. En M. Ashraf, M. Ozturk, & H. R. Athar (Eds.), *Salinity and Water Stress* (Vol. 44, pp. 117–127). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9065-3_13

- Larcher, W. (2003). *Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups* (4th ed). Springer.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Luo, Y., Li, W.-M., & Wang, W. (2008). Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress? *Environmental and Experimental Botany*, 63(1–3), 378–384.
- Ma, C., Wang, Z., Kong, B., & Lin, T. (2013). Exogenous trehalose differentially modulate antioxidant defense system in wheat callus during water deficit and subsequent recovery. *Plant Growth Regulation*, 70(3), 275–285. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9799-2>
- Macovei, A., Pagano, A., Cappuccio, M., Gallotti, L., Dondi, D., De Sousa Araujo, S., Fevereiro, P., & Balestrazzi, A. (2019). A Snapshot of the Trehalose Pathway During Seed Imbibition in *Medicago truncatula* Reveals Temporal- and Stress-Dependent Shifts in Gene Expression Patterns Associated With Metabolite Changes. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1590. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01590>
- Magnani, L., Gaydou, E. M., & Hubaud, J. C. (2000). Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta*, 411(1–2), 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00717-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00717-0)

- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469–474.
- Martinez-Cruz, E. (2014). *Cultivo in vitro mediante embriogénesis somática y transformación genética de maíz (Zea mays L.) con genes de biosíntesis de trehalosa* [Tesis Doctoral, Universidad Autonoma Chapingo]. <https://chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISDCH2014063009127253.pdf>
- Mazher, A. A., El-Quesni, E. F., & Farahat, M. (2007). Responses of ornamental and woody trees to salinity. *World J Agric Sci*, 3(3), 386–95.
- McNeil, S. D., Nuccio, M. L., Rhodes, D., Shachar-Hill, Y., & Hanson, A. D. (2000). Radiotracer and Computer Modeling Evidence that Phospho-Base Methylation Is the Main Route of Choline Synthesis in Tobacco. *Plant Physiology*, 123(1), 371–380. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.371>
- Mishra, P., Bhoomika, K., & Dubey, R. S. (2013). Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Protoplasma*, 250(1), 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0365-3>
- Mostafa, M. R., Mervat, Sh. S., Safaa, R. E.-L., Ebtihal, M. A. E., & Magdi, T. A. (2015). Exogenous α -tocopherol has a beneficial effect on *Glycine max* (L.) plants irrigated with diluted sea water. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(2), 195–202. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11513172>
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2015). Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: Oxidative damage and co-

- induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Protoplasma*, 252(2), 461–475. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0691-3>
- Muhammad Jamil. (2012). Salinity induced changes in cell membrane stability, protein and RNA contents. *African Journal of Biotechnology*, 11(24). <https://doi.org/10.5897/AJB11.2590>
- Müller, J., Boller, T., & Wiemken, A. (1995). Trehalose and trehalase in plants: Recent developments. *Plant Science*, 112(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04218-J](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04218-J)
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651–681.
- Nedjimi, B. (2014). Effects of salinity on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in three saltbush species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 52, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.10.007>
- Nounjan, N., & Theerakulpisut, P. (2012). Effects of exogenous proline and trehalose on physiological responses in rice seedlings during salt-stress and after recovery. *Plant, Soil and Environment*, 58(No. 7), 309–315. <https://doi.org/10.17221/762/2011-PSE>
- Patist, A., & Zoerb, H. (2005). Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40(2), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.05.003>
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 417–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092945>

- Ponnu, J., Wahl, V., & Schmid, M. (2011). Trehalose-6-Phosphate: Connecting Plant Metabolism and Development. *Frontiers in Plant Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00070>
- Rohman, M. M., Talukder, M., Hossain, M., Uddin, M., Amiruzzaman, M., Biswas, A., Ahsan, A., Chowdhury, M., & others. (2016). Saline sensitivity leads to oxidative stress and increases the antioxidants in presence of proline and betaine in maize ("Zea mays" L.) inbred. *Plant omics*, 9(1), 35.
- Sadak, M. S. (2019). Physiological role of trehalose on enhancing salinity tolerance of wheat plant. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0098-6>
- Sadak, M. S., & Ahmed, M. (2016). Physiological role of cyanobacteria and glycinebetaine on wheat plant grown under salinity stress. *Inter J of Pharm Tech Res*, 9(7), 78–92.
- Stiekema, W. J., Heidekamp, F., Dirkse, W. G., van Beckum, J., de Haan, P., Bosch, C. ten, & Louwerse, J. D. (1988). Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 11(3), 255–269. <https://doi.org/10.1007/BF00027383>
- Svanström, AAsa, van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J., & Melin, P. (2014). Trehalose synthesis in *Aspergillus niger*: Characterization of six homologous genes, all with conserved orthologs in related species. *BMC microbiology*, 14(1), 90.
- Tawfik, M. M., A. Badr, E., Ibrahim, O. M., M. Abd Elh, E., & Sh. Sadak, M. (2016). Biomass and Some Physiological Aspects of *Spartina patens* Grown under Salt Affected Environment in South Sinai. *International Journal of Agricultural Research*, 12(1), 19–27. <https://doi.org/10.3923/ijar.2017.19.27>

- van Dijken, A. J. H., Schluepmann, H., & Smeekens, S. C. M. (2004). Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiology*, 135(2), 969–977. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039743>
- Wang, S., Ouyang, K., & Wang, K. (2019). Genome-Wide Identification, Evolution, and Expression Analysis of TPS and TPP Gene Families in *Brachypodium distachyon*. *Plants*, 8(10), 362. <https://doi.org/10.3390/plants8100362>

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 1. Efecto del estrés salino en los parámetros fenotípicos en plántulas de maíz (*Zea mays*) por aplicación de solución a base de NaCl.

Tratamientos	Altura (cm)		Numero de Hojas	
	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible
Control	12.713±1.907 ^b	11.164±1.339 ^a	3.313±0.464 ^{ab}	3.071±0.267 ^{ab}
Salinidad 3.7 mS	13.213±1.248 ^b	11.173±1.256 ^a	3.313±0.464 ^a	3.437±0.512 ^a
Salinidad 6.7 mS	11.494±1.933 ^b	11.319 ±1.602 ^a	3±0.01 ^b	3.062±0.442 ^b

Los valores son las medias (n = 16) ± DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$)

Anexo 2.

Tabla 2. Efecto del estrés salino en los parámetros fisiológicos en plántulas de maíz (*Zea mays*) por aplicación de solución a base de NaCl.

	Tratamientos					
	Control		Salinidad 3.7 mS		Salinidad 6.7 mS	
	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible
chl a (mg/g)	1.394±0.206 ^{bc}	1.750±0.345 ^a	1.275±0.175 ^c	1.861±0.198 ^a	1.670±0.388 ^{ab}	1.698±0.297 ^a
chl b (mg/g)	0.399±0.065 ^b	0.509±0.094 ^a	0.372±0.062 ^b	0.529±0.078 ^a	0.478±0.214 ^b	0.497±0.100 ^a
Carotenoides (mg/g)	0.226±0.062 ^{bc}	0.269±0.099 ^{ab}	0.173±0.031 ^c	0.313±0.030 ^a	0.302±0.040 ^a	0.231±0.067 ^{bc}
Estabilidad de la membrana (%)	21.53±5.949	18.12±3.57%	20.52±6.52%	21.93±11.48	24.22±11.063%	-

Los valores son las medias ± DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$)

Anexo 3.

Tabla 3. Efecto del estrés salino en los parámetros bioquímicos en plántulas de maíz (*Zea mays*) por aplicación de solución a base de NaCl.

	Pentosas (µg/g)		Hexosas (µg/g)		Prolina (µmo/g)	
	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible
Control	116.486±30.642 ^a	25.259±7.286 ^b	99.702±22.584 ^a	22.995±6.545 ^b	30.694±3.525 ^b	18.277±0.894 ^c
Salinidad 3.7 mS	114.266±25.333 ^a	37.278±7.024 ^b	112.474±23.458 ^a	34.152±4.334 ^b	2.244±0.810 ^e	63.111±1.257 ^a
Salinidad 6.7 mS	113.668±24.971 ^a	25.154±5.080 ^b	107.779±23.382 ^a	26.447±4.288 ^b	12.777±1.181 ^d	5.527±1.113 ^e

Los valores son las medias ± DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$)

Anexo 4.

Tabla 4. Efecto del estrés salino en los parámetros enzimáticos en plántulas de maíz (*Zea mays*) por aplicación de solución a base de NaCl.

	Tratamientos					
	Control		Salinidad 3.7 mS		Salinidad 6.7 mS	
	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible
SOD (U/mg)	0.045±0.012	0.063±0.001	0.17±0.008	0.045±0.006	0.007±0.001	0.040±0.002
POD (U/mg)	0.138±0.034 ^a	0.120±0.009 ^c	0.069±0.033 ^e	0.122±0.008 ^b	0.088±0.047 ^f	0.106±0.020 ^d
APX (U/mg)	14.678±3.051 ^a	11.838±1.771 ^b	16.298±3.014 ^a	12.935±2.083 ^b	13.470±3.084 ^a	11.548±1.813 ^b
CAT (U/mg)	4.826±1.476 ^d	5.1181±1.726 ^{cd}	11.544±1.133 ^a	6.942±1.726 ^b	6.637±2.318 ^{bc}	4.706±0.929 ^d

Los valores son las medias ± DE. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$)